

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Année 1959

N° 031

T H E S E

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(diplôme d'Etat)

PAR

FRANCQ, Jean-Claude, né le 3.7.1932

(Assistant à l'Institut Pasteur)

Présentée et soutenue publiquement le 1959

CONTRIBUTION A L'ETUDE IMMUNOLOGIQUE

DE LA

POLYARTHRITE CHRONIQUE EVOLUTIVE

Président : M.P. MOLLARET, Professeur

Travail du Laboratoire d'Hématologie et des Groupes Sanguins
de l'INSTITUT PASTEUR de PARIS
Chef de Laboratoire : Dr. EYQUEM



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547108_0034

FACULTE de MEDECINE de PARIS

Nom du Candidat:..... F R A N C Q

Prénom:..... Jean-Claude

Date de la soutenance.....

Numéro d'ordre.....



FRANCQ (Jean-Claude)
Contribution à l'étude
immunologique de la
Polyarthrite chronique
évolutive.
Paris 1959, ronéotypée
in-4°, 96 p.
(Th. méd. (Et.), Paris
1959, n°)
Institut Pasteur Edit.

FRANCQ (Jean-Claude)
Contribution à l'étude
immunologique de la
Polyarthrite chronique
évolutive.
Paris 1959, ronéotypée
in-4°, 96 p.
(Th. méd. (Et.), Paris
1959, n°)
Institut Pasteur Edit.

FRANCQ (Jean-Claude)
Contribution à l'étude
immunologique de la
Polyarthrite chronique
évolutive.
Paris 1959, ronéotypée
in-4°, 96 p.
(Th. méd. (Et.), Paris
1959, n°)
Institut Pasteur Edit.

FRANCQ (Jean-Claude)
Contribution à l'étude
immunologique de la
Polyarthrite chronique
évolutive.
Paris 1959, ronéotypée
in-4°, 96 p.
(Th. méd. (Et.), Paris
1959, n°)
Institut Pasteur Edit.

FACULTE DE MEDECINE DE P A R I S

Année 1 9 5 9

N°

T H E S E
pour le
D O C T O R A T E N M E D E C I N E
(diplôme d'Etat)

par

F R A N C Q, Jean-Claude, né le 3.7.1932
Assistant à l'Institut Pasteur

Présentée et soutenue publiquement le

1959

CONTRIBUTION A L'ETUDE IMMUNOLOGIQUE
de la
POLYARTHRITE CHRONIQUE EVOLUTIVE

:--:--:--:--:--:--:



Président: M.P. MOLIARET, Professeur

Travail du Laboratoire d'Hématologie et des Groupes
Sanguins de l'INSTITUT PASTEUR de PARIS
Chef de Laboratoire: Dr EYQUEM

PROFESSEURS HONORAIRES:

AUBIN (A.), BENARD (H.), BROCC (P.), BULLIARD (H.), CADENAT (F.),
 COL (E.), CHAMPY (C.), CHEVALLIER (P.), DEBRE (R.), DONZELOT
 , GASTINEL (P.), GUILLAIN (G.), HALPHEN (E.), HARVIER (P.),
 RD (R.), HEUYER (G.), LANTUEJOUL (P.), LAROCHE (G.), LAUBRY (C.),
 -SOLAL (E.), LHERMITTE (J.), LIAN (C.), LOEPER (M.), MARION (G.),
 IEU (P.), MOCQUOT (P.), MONDOR (H.), MONOD (R.), MOREAU (R.),
 N (P.), OLIVIER (E.), RICHT (C.), STROHL (A.), TANON (L.),
 ER (E.).

DOYEN..... Léon BINET
 Membre de l'Institut

ASSESEUR..... Jean VERNE

I.- PROFESSEURS

MM.

atomie.....	CORDIER (G.)
atomie (Chaire à titre personnel....	DELMAS (A.)
atomie pathologique.....	DELARUE (J.)
sthésiologie.....	BAUMANN (J.)
tériologie.....	FASQUELLE (R.)
chimie médicale.....	JAYLE (M.F.)
logie appliquée à l'Education	
physique eu aux sports	CHAILLEY-BERT (P.)
logie médicale	FAUVERT (R.)
écérologie médicale et sociale.....	BERNARD (J.)
unique carcinologique (Inst.	
G. Roussy).....	REDON (H.)
unique cardiologique (Broussais)....	MOUQUIN (M.)
(Beaujon.....	SICARD (A.)
)Cochin	QUENU (J.)
Uniques chirurgicales(Hôtel-Dieu....	MENEGAUX (G.)
)Saint-Antoine.	GOSSET (J.)
(Salpêtrière...)	MOULONGUET (P.)
unique de chirurgie infantile	
et orthopédique (Enfants	
Malades).....	FEVRE (M.)
unique chirurgicale orthopédique	
et réparatrice (Cochin).....	MERLE d'AUBIGNE (R.)
unique de chirurgie cardio-vas-	
culaire (Broussais).....	GAUDART-d'ALLAINES (F.de)
unique de chirurgie plueropul-	
monaire (Laënnec).....	MATHEY (J.)
unique endocrinologique (Pitié).....	DECOURT (J.)
unique génétique médicale	
(Enfants Malades).....	LAMY (M.)

inique gynécologique (Broca)	FUNCK-BRENTANO (P.)
inique des maladies cutanées et syphilitiques (St-Louis).....	DEGOS (R.)
inique des maladies des enfants (Enfants-Malades).....	CATHALA (J.)
inique des maladies infectieuses (Claude-Bernard).....	MOLLARET (P.)
inique des maladies mentales et de l'encéphale (Ste-Anne).....	DILAY (J.)
inique des maladies métaboliques (Necker)	HAMBURGER (J.)
inique des maladies du sang (Broussais)	MARCHAL (G.)
inique des maladies du système nerveux (Salpêtrière).....	ALAJOUANINE (T.)
	(Broussais..... GENNES (L. de)
	) Cochin..... JUSTIN-BESANCON (L.)
iniques médicales..	(Hôtel-Dieu..... BARIETY (M.)
	) Lariboisière... SOULIE (P.)
	(Pitié..... DREYFUS (G.)
	) St-Antoine..... KOURILSKY (R.)
inique médicale d'hydrologie théra- peutique et climatologie (Bichat).	DEBRAY (C.)
inique médicale propédeutique	PASTEUR VALLERY-RADOT (L.)
inique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu).....	DEROT (M.)
inique de neuro-chirurgie (Pitié)....	PETIT-DUTAILLIS (D.)
	(Baudelocque.... LACOMME (M.)
iniques obstétricales	Port-Royal..... N...
	(Tarnier..... VARANGOT (J.)
inique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)..	RENARD (G.)
inique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière).....	AUBRY (M.)
inique de pédiatrie sociale (Enfants Malades).....	MARIE (J.)
inique de pneumo-phtisiologie (Laënnec)	BERNARD (E.)
inique psychiatrique infantile (Salpêtrière).....	MICHAUX (L.)
inique de puériculture (St-Vincent-de-Paul).....	LELONG (M.)
inique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin).....	COSTE (F.)
inique stomatologique (Pitié).....	DECHAUME (M.)
inique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard).....	SENEQUE (J.)
inique thérapeutique médicale (St-Antoine).....	LEMAIRE (A.)
inique urôlogique.....	FEY (B.)

ptrophysiologie médicale (chaire à titre personnel).....	DJOURNO (A.)
ryologie.....	GIROUD (A.)
toire de la médecine et de la chirurgie.....	N...
tologie.....	DEPARIS (M.)
ienne des collectivités (chaire à titre personnel).....	DEPARIS (M.)
ienne et clinique de la première enfance.....(Trousseau).....	TURPIN (R.)
ienne et médecine préventive.....	JOANNON (P.)
ecine du travail	DESOILLE (H.)
ecine légale.....	PIEDELIEVRE (R.)
asitologie	GALLIARD (H.)
hologie chirurgicale.....	COUVELAIRE (R.)
hologie exotique.....	LAVIER (G.)
hologie expérimentale et comparée.....	LENEGRE (J.)
hologie humorale et immunologie.....	
expérimentale (chaire à titre person- nel).....	MERKLEN (F.-P.)
hologie médicale.....	N..
hologie et thérapeutique générales....	GARCIN (R.)
armacologie et matière médicale.....	CHEYMOL (J.)
siologie.....	BINET (L.)
siologie(chaire à titre personnel)....	BARGETON (D.)
siologie médicale.....	DOGNON (A.)
siologie médicale.....	DESGREZ (H.)
hnique chirurgicale.....	PATEL (J.)
rapeutique.....	BROUET (G.)

II.- PROFESSEURS SANS CHAIRE,

PROFESSEURS AGREGES ET MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES

	MM.
tomie.....	(CABROL (C.)
.....	) COUINAUD (C.)
.....	(OLIVIER (G.)
tomie pathologique.....	(GAUTHIER-VILLARS (Mlle P.)
	) pr.s. ch.
	(BUSSER (F.)
	) GOUYGOU (Ch.)
	(ORCEL (L.)
	) PAILLAS (J.)
sthésiologie.....	VOURC'H (G.)
tériologie.....	(NEVOT (A.) pr. s. ch.
	) BARBIER (P.)
	(CHRISTOL (D.)
	) TOURNIER (P.)

Chimie médicale.....	(DESGREZ (P.) pr. s. ch.
.....	) POLONOSKI (J.) m. conf.
.....	) SCHAPIRA (G.) m. conf.
Biologie médicale.....	) BOURLIERE (F.) m. conf.
Carcinologie.....	(DENOIX (P.)
.....	) MATHE (G.)
Dermato-syphiligraphie.....	DUPERPAT (B.)
Electro-radiologie.....	LEDOUX-LEBARD (G.)
Embryologie.....	TUCHMANN-DUPLESSIS (H.)
Entomologie.....	(BILSKI-PASQUIER (G.)
.....	) DAUSSET (J.)
Etatologie.....	(GOUJARD (R.) pr. s. ch.
.....	) MAROIS (M.)
.....	) RACADOT (J.)
Géologie.....	CORNET (A.)
Hygiène.....	(BOYER (J.) pr. s. ch.
.....	) CORRE-HUST (Mme L.)
Maladies infectieuses.....	(BASTIN (R.)
.....	) DUPONT (V.)
Médecine légale.....	(DEROBERT (L.) pr. s. ch.
.....	) HADENGUE (A.)
.....	) FOURNIER (E.)
.....	) GUENIOT (M.)
Médecine du travail.....	ALBAHARY (C.)
Orto-chirurgie.....	DAVID (M.)
Ourologie.....	LHERMITTE (F.)
Obstétrique.....	(GRANJON (A.)
.....	) HERVET (E.)
.....	) LE LORIER (G.)
.....	) MORIN (P.)
.....	) MUSSET (R.)
.....	) ROBEY (M.)
.....	) THOYER-ROZAT (J.)
Ophthalmologie.....	BREGEAT (P.)
.....	) SARIAUX (H.)
Orthopédie.....	(JUDET (R.)
.....	) RAMADIER (J.)
Oto-rhino-laryngologie.....	DEBAIN (J.)
Parasitologie.....	(BRUMPT (L.C.) pr. s. ch.
.....	) CHABAUD (A.)
Pathologie chirurgicale.....	BARCAT (J.)
.....	) BINET (J.-P.)
.....	) CAUCHOIX (J.)
.....	) CHATELIN (C.-L.)
.....	) DUBOST (Ch.)
.....	) DUBOST (Cl.)
.....	) FAUREL (J.)
.....	) FLABEAU (F.)
.....	) GERMAIN (A.)
.....	) LAURENCE (G.) agr. per.
.....	) LORTAT-JACOB (J.-L.)
.....	) LOYGUE (J.)
.....	MERCADIER
.....	PERROTIN (J.)
.....	ROBERT (H.)
.....	THOMERET (G.)

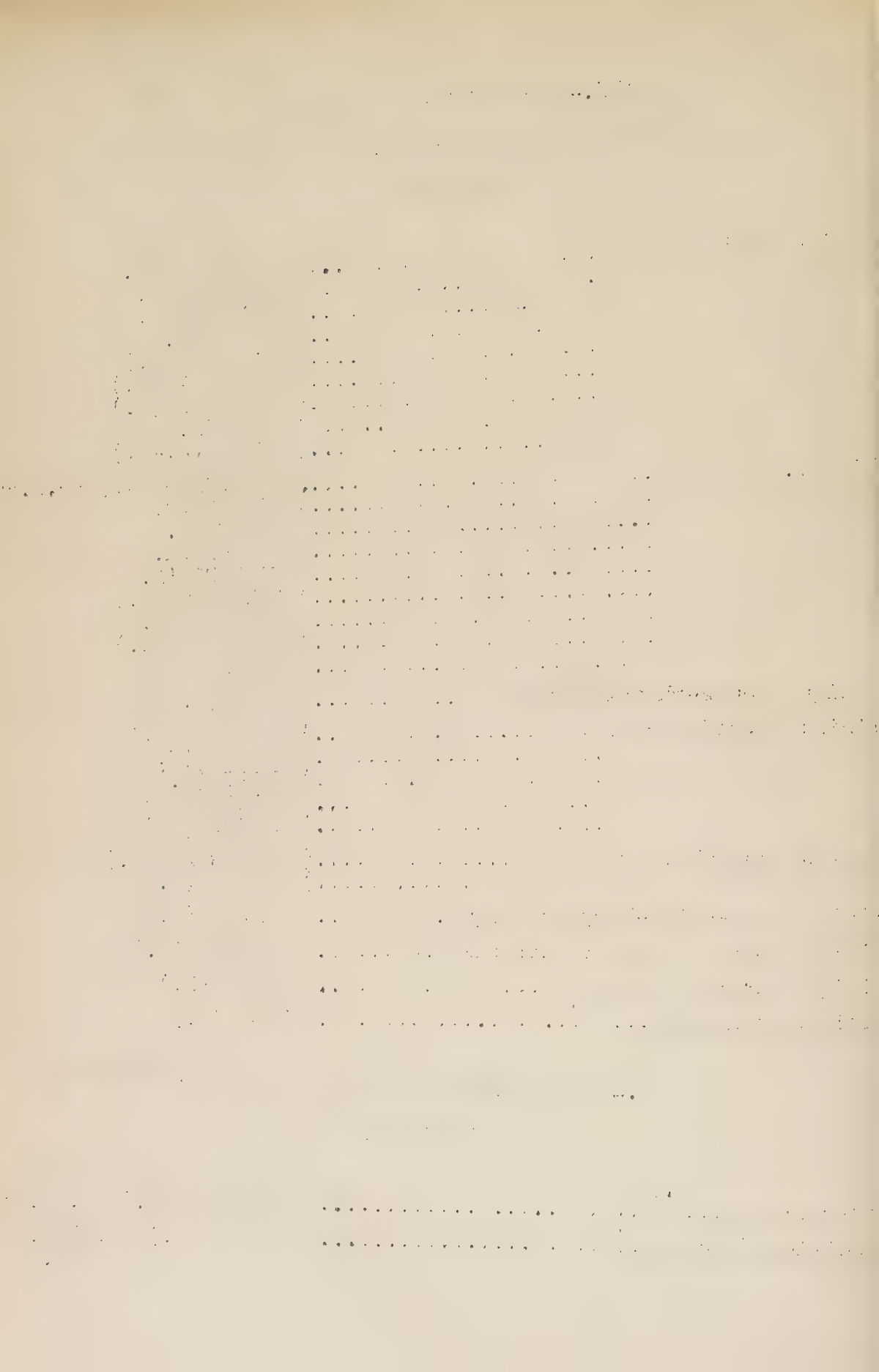
hologie exotique.....	SCHNEIDLER (J.)
hologie expérimentale.....	(CROSNIER (J.)
.....	(HARTMANN (L.)
.....	(LOEPER (J.)
.....	(MAURICE (J.)
.....	(PLAS (F.)
.....	(RICHEL (G.)
hologie médicale.....	(AUSSANNAIRE (M.)
.....	(BOUR (H.)
.....	(BOUVIER (J.)
.....	(BOUVRAIN (Y.)
.....	(BRICAIRE (H.)
.....	(BRISSAUD (H.)
.....	(BROCARD (H.)
.....	(BUGE (A.)
.....	(CASTAIGNE (P.) m. conf.
.....	(CATINAT (J.)
.....	(CONTAMIN (F.)
.....	(COURY (C.)
.....	(FREZAL (J.)
.....	(HOUSSET (E.)
.....	(LAROCHE (Cl.)
.....	(LESOBRE (R.)
.....	(MACREZ (C.)
.....	(NICK (J.)
.....	(PEQUIGNOT (H.) m. conf.
.....	(ROYER (P.)
.....	(WOLFROMM (R.)
hiatrie-puériculture.....	(JOSEPH (R.)
.....	(MANDE (R.)
.....	(MOZZINONACCI (P.)
.....	(POLONOVSKI (C.)
.....	(ROSSIER (A.)
armacologie.....	(LEVY (Mlle J.) pr. s. ch.
.....	(BOISSIER (J.)
.....	(LICHAT (P.)
ysiologie.....	(PARROT (J.) pr. s. ch.
.....	(DEJOURS (P.)
ysique médicale.....	(GOUGEROT (L.) m. conf.
umo-phtisiologie.....	(KREIS (B.)
ychiatrie.....	(PICHOT (P.)
ychiatrie infantile.....	(DUCHE (D.)
umatologie.....	(DELBARRE (F.)
omatologie.....	(CERNEA (P.)
.....	(CHAPUT (Mme A.) m.c. agr.
.....	(GRELIET (M.)
érapeutique.....	(CHASSAGNE (P.)
.....	(LAMOTTE (M.)
ologie.....	(QUENU (L.)

III.- PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES
CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE A TITRE
PERMANENT

inique chirurgicale.....	(ABOULKER (P.)
.....	) AMELINE (A.)
.....	) HUGUIER (J.)
.....	) LEGER (L.)
.....	) OLIVIER (C.)
.....	) PADOVANI (P.)
.....	) POILLEUX (F.)
.....	) ROUX (M.)
.....	) VERNE (J.-M.)
inique médicale.....	(HAGUENEAU (J.) pr.s.ch.
.....	) BOUDIN (G.)
.....	) CONTE (M.)
.....	) DOMART (A.)
.....	) MILLIEZ (P.)
.....	) PERRAULT (M.)
.....	) RAMBERT (P.)
.....	) THIEFFRY (S.)
.....	) TURIAF (J.)
inique neuro-rhumatologique.....	SEZE (S. de)
inique obstétricale.....	) GRASSET (J.)
.....	) LEPAGE (F.)
.....	) MAYER (M.)
.....	) MERGER (R.)
.....	) RAVINA (J.)
inique ophtalmologique.....	(DESVIGNES (P.)
.....	) OFFRET (G.)
inique oto-rhino-laryngologique.....	MADURO (R.)
inique pédiatrique et puériculture.....	LAPLANE (R.)
inique psychiatrique.....	BARUK (H.)
inique urologique.....	KUSS (R.)

IV.- PROFESSEURS DETACHEES DANS LES UNIVERSITES
ETRANGERES

ctériologie.....	HAUDUROY (P.) pr. s. ch.
ochimie médicale.....	ETTORI (J.) pr. à t. pers.



Pathologie chirurgicale.....	RUDLER (J.) pr.s. ch.
Secrétaire Général de la Faculté.....	M. LENA (J.)
Secrétaires.....	Mme BEURLAND(H.)
.....	Mlle CHAINTREUIL (G.)
.....	Mlle HURE (A.)
Conservateur, chargé de la direction de la bibliothèque.....	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateurs.....	Mlles DUMAITRE (P.)
.....	GOICHON (A.-M.)
Bibliothécaires.....	Mme CONTET (J.)
.....	Mlles LAURENT (H.)
.....	LE NOIR (G.)
.....	QUIEVREUX (E.)

A MA FEMME

A MES FILS

A MES PARENTS

A MES BEAUX-PARENTS

A MA FAMILLE

A Monsieur le Professeur MOLLARET

Professeur de clinique des Maladies Infectieuses

Médecin de l'Hôpital Claude Bernard

Chef de Service à l'Institut Pasteur

qui nous a fait l'honneur d'accepter la
présidence de cette thèse. Qu'il veuille
bien accepter l'hommage de notre respectueuse
reconnaissance.

A notre maître le Docteur EYQUEM

Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur

qui nous a guidé de son expérience et de
ses conseils tout au long de la réalisation
de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression
de notre reconnaissance.

A Monsieur le Docteur R. DUJARRIC DE LA RIVIERE

Membre de l'Institut, et de l'Académie Nationale de Médecine

Sous-Directeur Honoraire de l'Institut Pasteur

Commandeur de la Légion d'Honneur

qui nous a fait l'honneur de nous accueillir
dans son Service. En témoignage de notre
respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur Jacques TREFOUEL

Directeur de l'Institut Pasteur

Membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine

en témoignage de notre très respectueux
hommage.

A Monsieur le Docteur AUBLANT,

Secrétaire Général de l'Institut Pasteur

A Monsieur le Docteur MARNEFFE,

Sous-Directeur de l'Institut Pasteur.

1791. The first of the year was a very cold one, and the weather was very disagreeable. The snow was very deep, and the wind was very strong. The people were very much distressed, and the cattle were very much starved. The people were very much distressed, and the cattle were very much starved.

The second of the year was a very cold one, and the weather was very disagreeable. The snow was very deep, and the wind was very strong. The people were very much distressed, and the cattle were very much starved.

The third of the year was a very cold one, and the weather was very disagreeable. The snow was very deep, and the wind was very strong. The people were very much distressed, and the cattle were very much starved.

The fourth of the year was a very cold one, and the weather was very disagreeable. The snow was very deep, and the wind was very strong. The people were very much distressed, and the cattle were very much starved.

A Monsieur le Docteur BONNEPOI

Chef de Service à l'Institut Pasteur

Officier de la Légion d'Honneur

a qui nous devons d'appartenir à la
grande famille pasteurienne.

A Monsieur P. GRABAR

Chef de Service à l'Institut Pasteur

Chevalier de la Légion d'Honneur.

dans son service, nous avons pu nous
initier aux méthodes immuno-chimiques;
qu'il trouve ici, ainsi que ses
collaborateurs, nos plus vifs remerciements.

THESE ARE THE RESULTS OF THE
ANALYSIS OF THE SAMPLES OF
THESE ARE THE RESULTS OF THE
ANALYSIS OF THE SAMPLES OF
THESE ARE THE RESULTS OF THE
ANALYSIS OF THE SAMPLES OF
THESE ARE THE RESULTS OF THE
ANALYSIS OF THE SAMPLES OF

A Madame PODLIACHOUCK,

Assistante à l'Institut Pasteur, notre Collègue
au laboratoire d'Hématologie et des Groupes Sanguins
qui nous a fait bénéficier d'un
vaste clavier de réactions sérolo-
giques

A Monsieur le Docteur JACQUELINE

Médecin de l'Hôpital de la Reine Victoria (Aix-les-
Bains)

qui a satisfait nos demandes
inlassables de sérum.

A Monsieur COULON

Préparateur

A Mademoiselle Marie-Christine FREMONT

qui nous ont apporté leur aide
technique.

TABLE DES MATIERES

I) INTRODUCTION

Polyarthrite chronique évolutive, rhumatismes inflammatoires chroniques et dysprotéïnémies.

Buts et plan du travail.

II) MATERIEL, REACTIFS, METHODES

a) matériel: sérums, euglobulines, éluats

b) réactifs:

1°) immun-sérums anti-sérum humain normal

2°) immun-sérums anti-sérum pathologique (P.C.E.)

3°) globulines gamma purifiées humaines et animales

c) méthodes:

1°) réactions de précipitation en gel:

- double diffusion

- immuno-électrophorèse

2°) réactions d'agglutination:

- facteur agglutinant

- facteur anti-globulinique

III) MODIFICATIONS NON SPECIFIQUES

a) description globale des résultats fournis par les immun-sérums employés

b) résultats analytiques

c) bilan de ces modifications

IV) MODIFICATIONS SPECIFIQUES

A) Identification des facteurs agglutinants et anti-globuliniques

a) mobilité électrophorétique de ces facteurs en gélose

b) étude des euglobulines de S.H.N. et de S.P.C.E.

c) identification de la C.R.P.

d) identification des deux facteurs:

1°) par épuisement des immun-sérums

2°) par élution:

- à partir de G.R.S.

- à partir de globulines gamma agrégées

B) Origine et signification réelle des protéines mises en évidence

a) immuno-électrophorèse en fluorescence

b) étude du facteur antiglobuline animale

c) passage du facteur dans l'urine; rapports avec la fibrinolyse

d) immuno-électrophorèse modifiée: pH 9 ou force ionique élevée

V) RECHERCHE DE PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES PROPRES AUX PROTEINES DE P.C.E.

Immunisation de lapins ou de poules avec:

1°) du sérum de P.C.E.

2°) des euglobulines

3°) du facteur purifié

VI) ETUDE DU DETERMINANT ANTIGENIQUE DES DEUX FACTEURS

a) étude de l'immun-sérum de lapin sensibilisant employé pour la réaction Heller-Svartz

b) étude de la globuline gamma humaine agrégée par chauffage

c) existence d'une communauté gamma agrégée, anticorps de lapin

VII) DISCUSSION

A) Quantité de facteurs et limite de sensibilité de la méthode employée

B) Unicité des facteurs sérologiques

C) Nature:

a) métabolite non spécifique

b) identité avec une fraction du complément

c) auto-anticorps

D) Signification: le facteur sérologiquement mis en évidence est-il l'agent ou le témoin de l'affection?

VIII) CONCLUSIONS

Parmi les rhumatismes inflammatoires chroniques dégératifs (Polyarthrite chronique évolutive, spondylarthrite ankylosante, rhumatisme psoriasique, rhumatisme goutteux, rhumatisme palindromique, syndrome de Reiter-Fiessinger-Leroy, rhumatisme lupique, rhumatisme de la maladie Périodique, etc...) de fréquence et de distribution très inégales, Polyarthrite chronique évolutive (P.C.E.) et spondylarthrite ankylosante occupent une place prépondérante. La P.C.E. atteint davantage les femmes (75% des cas chez qui elle est en général plus sévère); sa fréquence est quatre fois plus élevée que celle de la spondylarthrite (qui atteint l'homme dans 90% des cas).

Son étude est attachante à un double titre : d'une part, il semble légitime d'évaluer à plus de 10.000 le nombre de nouveaux cas de polyarthrite chronique évolutive, chaque année en France (ce chiffre a été calculé à partir de vastes enquêtes effectuées à l'étranger) et si, sauf exception, les atteintes articulaires ne mettent pas la vie du malade en péril, leurs conséquences sociales et économiques apparaissent très fâcheuses; d'autre part, la polyarthrite chronique évolutive compte parmi les affections pour lesquelles un mécanisme d'agression auto-entretenu peut être à bon droit évoqué.

L'étude en est facilitée par la propriété aisément mise en évidence dans le sérum de 70 (à 90%) des malades atteints de polyarthrite chronique évolutive confirmée contre 2 (à 10%)

des témoins présentant soit une spondylarthrite, (d'où l'intérêt majeur pour le diagnostic différentiel polyarthrite-spondylarthrite) soit diverses affections non rhumatoïdes.

Deux remarques importantes sont à faire dès l'abord. Cette différence dans le pourcentage des "faux négatifs" (où le diagnostic clinique n'est pas confirmé par la réaction sérologique) ressort davantage à la sélection des cas inclus dans la statistique : âge des malades, durée d'évolution et surtout rigueur du diagnostic clinique qu'à la qualité intrinsèque de la modalité de la réaction employée ou du laboratoire qui l'exécute. Toutefois, d'autant moins élevé sera le titre considéré comme significatif d'une polyarthrite chronique évolutive, d'autant plus proche de la positivité idéale seront les résultats, avec, en contrepartie, une élévation du taux de "faux-positifs".

Une mention spéciale doit être réservée aux collagénoses; le Lupus Erythémateux Disséminé fournirait en effet 30% de résultats positifs, périarthérite noueuse, sclérodermie et dermatomyosite, 20 % environ (15).

Le mécanisme commun aux principales réactions successivement proposées pour la mise en évidence de cette activité caractéristique des sérums de polyarthrite chronique évolutive : réactions de Waaler-Rose, de Heller-Svartz d'une part, réactions d'agglutination de globules rouges tannés ou de particules de latex ayant fixé une globuline γ humaine ou animale dénaturée; d'autre part, la conduite pratique de leur exécution et leur intérêt diagnostique respectif ont fait l'objet d'une mise au point exhaustive par notre maître, le Dr.Eyquem

* * * *
* * *
* *
*

Nous dirons que la Polyarthrite chronique évolutive s'accompagne de modifications sériques révélabiles par deux groupes de méthodes et considérées comme spécifiques : méthodes physico-chimiques, ultra-centrifugation (10), méthodes sérologiques, réactions d'agglutination de particules sensibilisées soit par l'anticorps correspondant soit par une globuline γ liée non immunologiquement (dans tous les cas systèmes instables à la limite de l'auto-agglutination, d'où les appellations de facteurs agglutinant et anti-globuliniques). Il découle de cette définition que d'autant plus proche de l'auto-agglutination sera le système particulaire réalisé, d'autant plus élevés seront les titres fournis par les sérums de polyarthrite chronique évolutive...; le mode de lecture utilisé pour la définition de l'état agglutiné intervient également : avec ou sans agitation du culot de sédimentation; enfin, les réactions "sensibilisées" par l'équipe du Laboratoire d'hématologie et des groupes sanguins sont de l'ordre de 1/1000 pour les réactions d'agglutination de globules rouges humains sensibilisés et de 1/5000 pour les réactions mettant en évidence le facteur anti-globulinique; il est fréquent de rencontrer des publications décrivant des titres de 1/2000, à 1/80000, sans que ces titres impliquent une quantité absolue supérieure de facteur agglutinant ou anti-globulinique; l'importance des statistiques du laboratoire justifiant cette affirmation (5).

Alors que l'ultracentrifugation du sérum normal montre dans le groupe des globulines de poids moléculaire élevé (I.E. supérieur à 15) une famille protéique de constante de sédimentation S 20 w. 19 (valeur corrigée 18,8), le sérum de polyarthrite chronique évolutive renfermerait fréquemment un complexe de constante S 22 (7), agent des différentes réactions sérologiques.

Cette singularité des sérums de Polyarthrite chronique évolutive devait engager à les soumettre à l'analyse immuno-électrophorétique qui a permis l'étude fine des sérums avec anomalies physico-chimiques analogues : Macroglobulinémies (2) ou immunologiques voisines : Lupus Erythémateux disséminé (13)

Cleve et Hartman (3) ont réalisé sur le sérum de 8 sujets atteints de P.C.E. une étude immuno-électrophorétique à l'aide de la micro-méthode et conclu à une augmentation des globulines α et β , sans avoir pu identifier le facteur agglutinant et la protéine anti- C.

Ce travail a donc eu pour but :

- de préciser les modifications non spécifiques présentes dans le sérum des malades atteints de rhumatisme inflammatoire chronique,
- de caractériser, par les méthodes immuno-chimiques en gels, les facteurs agglutinants et anti-globuliniques suspects d'être distincts.

A) Par leurs propriétés antigéniques

La caractérisation biochimique des groupements terminaux a en effet montré une spécificité individuelle des protéines anormales définissant les dysprotéïnémies et dont la traduction immunologique serait une spécificité tant d'affection (notion controversée) qu'individuelle.

a) de caractère soustractif :

perte de un ou plusieurs motifs antigéniques normaux, dont l'exemple est fourni par les globulines γ du myélome; une telle anomalie peut donc être mise en évidence à l'aide d'immunsérums anti-sérum humain normal.

b) de caractère additif : acquisition (ou révélation) de ou plusieurs motifs antigéniques absents des protéines normales; c'est le cas des macroglobulines de la maladie de Waldenström. Dans ce cas, il devient nécessaire de préparer des immunsérums spécifiques pour mettre en évidence la modification.

tache traduisant l'insolubilité de la protéine anormale dans le tampon 8,2 et 0,0025 M.

note : il est bien évident que ces deux types de modification peuvent coexister : c'est le cas des macroglobulinémies avec globulines γ anormales.

B) Par leurs (éventuelles) propriétés anticorps ;

au moyen de réactions de précipitation en gel utilisant comme antigène une globuline γ convenable.

Cette étude a été entreprise dans la perspective de mettre en évidence l'anomalie spécifique dans le sérum des 30% des malades atteints de Polyarthrite chronique évolutive cliniquement affirmée qui gardent, au long d'une évolution parfois sévère et qui confirme le diagnostic des réactions sérologiques négatives dans les multiples variantes successivement employées à la mise en évidence des facteurs agglutinant et antiglobulinique.

Plan d'étude

Pour les motifs exposés ci-dessus, notre étude immuno-chimique du sérum des malades atteints de rhumatisme inflammatoire chronique a successivement porté sur 4 points:

1°) Recherche de modifications quantitatives des protéines normales, révélées par l'immuno-électrophorèse au moyen de divers immun-sérums anti-sérum humain normal, préparés sous la direction de Mr Grabar.

2°) Recherche de propriétés immunologiques particulières aux protéines de la polyarthrite chronique évolutive; au moyen de l'immuno-électrophorèse et à l'aide d'immun-sérums spécifiques obtenus par injection de sérum de malades ou de préparations purifiées de protéines obtenues à partir de ces sérums.

3°) Identification des facteurs agglutinant et antiglobulinique responsables des réactions sérologiques utilisées pour le diagnostic de P.C.E.

4°) Recherche d'une communauté immunologique entre les déterminants antigéniques utilisés pour la mise en évidence de ces deux facteurs.

Lexique des abréviations utilisées.

Pour éviter les répétitions fastidieuses et schématiser les manipulations, nous nous sommes crus autorisés à employer les sigles suivants:

P.C.E. = Polyarthrite Chronique Evolutive

L.E.D. = Lupus Erythémateux Disséminé

I-S = Immun-Sérum

I-S A = Immun-Sérum Absorbé

S.H.N. = Sérum Humain Normal

S.P. = Sérum Pathologique (ici S.P. = S. de P.C.E.)

M. = Macro (ex.: bêta 2 M. = bêta 2 Macro)

491, 1299; 86, = n° des animaux ayant fourni l'immun-sérum.

I.E. = Immuno-Electrophorèse.

G.R. = Globules Rouges

S. = Sensibilisé(s)

H. = Homme

H-S = Réaction d'agglutination de Heller-Svartz

C.R.P. = C. Réactive Protéine = Protéine réagissant avec le polyside C

Exemple d'"équation".

[I-S 491 anti S.H.N / G.R.H.S.] = [I-S 491 anti S.H.N. / G.R.H. non S.] = [I-S. 491 anti-S.H.N].

se lira:

L'immun-sérum de cheval de cheval anti-sérum humain normal épuisé par des globules rouges humains sensibilisés reste identique à l'immun-sérum 491 épuisé par des globules rouges humains non sensibilisés, et à l'immun-sérum non épuisé 491 (ces trois propositions constituent les témoins d'une identification du facteur agglutinant par épuisement de l'I-S 491)

Matériel

Notre étude clinique a porté sur 62 cas de rhumatisme inflammatoire chronique:

- 1°) 47 cas de P.C.E. (dont 23 avec réaction de Heller-Svartz positive)
- 2°) 12 cas de spondylarthrite
- 3°) 3 cas de rhumatismes divers (1 rhumatisme goutteux et 2 rhumatismes psoriasiques).

Nous avons étudié: le sérum total provenant de ces 62 malades, ainsi que deux liquides articulaires, l'un négatif, l'autre positif en Heller-Svartz;

: des préparations concentrées et purifiées du facteur agglutinant obtenues;

A) soit par précipitations répétées à pH 5,8 et faible force ionique (la dialyse a été contrôlée par conductivité avec un pont de mesure Philipps; conductivité inférieure à 2.000 ohms à 20°); soit par précipitation à différents pH, entre pH 8,2 et pH 5 et faible force ionique; soit, au contraire, par précipitation à force ionique élevée: sulfate d' NH_4 entre 20 et 50 % de saturation, à la neutralité.

B) Soit par dissociation-élution à partir de globules rouges sensibilisés ou d'agrégats de globulines gamma humaines ou animales grégées par chauffage à 73°.

Réactifs

I) Immun-sérums

Nous avons employé des immun-sérums obtenus chez diverses espèces animales.

A) Immun-sérums anti-sérum humain normal:

d'origine 1°) équine: n° 282, 86, 491, (282 + Coquet),
1299, Estelle

2°) caprine: 4 sérums de chèvre

3°) cunículaire: 10 sérums de lapin (mélange)

: 4 sérums de lapin anti-euglobulines normales.

B) Immun-sérums "spécifiques":

1°) anti-sérum total de P.C.E.: 4 lapins + 5 poules.

2°) anti-euglobulines (3 fois précipitées) de P.C.E.:
5 poules.

3°) anti-facteur agglutinant: 5 poules + 2 lapins.

4°) anti-facteur antiglobulinique fixé sur latex
non sensibilisé: 4 poules
sensibilisé: 5 poules

C) Immun-sérums antiglobulines gamma

1°) humaine chauffée à 73° : 5 poules
chauffée à 63° : 5 poules

2°) de lapin : 5 poules anti-anticorps immuns de lapin
fixés sur G.R. de mouton.

II) Globulines

A) Globulines gamma humaines (fraction II de Cohn)

Lots 601, 606, 1014 (Squibb) (U.S. Red Cross)
globulines gamma thérapeutiques Croix Rouge Suisse
et Hollandaise C.T.R.A., "R".

B) Globulines gamma animales :

de porc et de boeuf fractionnées selon la méthode de
Cohn (Armour).

de lapin, précipitées par le sulfate d'ammonium.

Méthodes

I) Réactions de précipitation en gel

A) Principe:

Les réactions de précipitation en gel constituent la base de la méthode immuno-électrophorétique que l'on peut définir comme une méthode d'analyse bi-dimensionnelle, permettant de caractériser dans un mélange d'antigènes (solubles dans le tampon employé), chaque antigène à la fois par sa mobilité (premier temps: électrophorèse proprement dite) et par sa marque immunologique (deuxième temps: révélation immunologique).

Alors que dans des conditions standards stables la mobilité de chaque famille protéique est régie par la convergence des variables suivantes: forme (écart à la sphéricité de la pelote statistique), taille (poids moléculaire), charge nette au pH considéré, interactions protéines-support (ici la gélose), protéines - petits ions (ici essentiellement Ca et tampon véronal), la révélation immunologique reste conditionnée par les lois de l'équivalence Antigène/Anticorps et la qualité de l'immun-sérum employé.

Remarque:

1°) Dans le cas des immun-sérums de cheval (ceci n'est pas vrai pour l'âne), la zone d'équivalence étroite ne permet de conclure à l'absence d'un arc de précipitation avant d'avoir exploré une gamme suffisamment étendue de rapports Antigène/Anticorps.

2°) Une dimension supplémentaire peut être assignée à l'analyse immuno-électrophorétique en réalisant un marquage physique des protéines étudiées (antigène) ou de l'immun-sérum; nous avons préféré, pour ce faire, employer un colorant fluorescent: la Lissamine Rhodamine, plutôt qu'un radio-isotope.

3°) Dans les critères d'identification immuno-électrophorétiques, la prééminence doit être accordée à la "marque" immunologique, les mobilités variant en fonction des conditions

expérimentales, de l'âge du sérum, de la présence ou non des autres constituants du sérum.

B) Technique:

a) double diffusion:

nous avons employé les techniques en tube selon Oudin, dans un milieu à base de gélose ou de gélatine (pour éviter l'interaction de la gélose) en boîte selon Ouchterlony, ainsi que sur une plaque d'immuno-électrophorèse (pour étudier un grand nombre d'échantillons ou de dilutions) ou sur une lame de microscopie (pour les produits dont une très petite quantité était disponible).

b) Immuno-électrophorèse standard:

Dans la première partie de cette étude, la macrométhode originale de Grabar et Williams (8) a été employée. Les quantités d'antigène employées ont alors été de 0,05 à 0,10 ml pour des quantités d'anticorps de 0,8 à 1,2 ml.

Les immun-sérums spécifiques ont été employés sous forme de globulines précipitées par 33, 40 ou 50 % de sulfate d'ammonium selon l'origine animale, permettant une concentration de 2 à 8 fois des anticorps.

Par la suite, nous avons employé une semi-microméthode, directement inspirée de celle du Dr Seligman qui a l'avantage d'être plus rapide dans son développement et plus économique en immun-sérum (plaques de 13-18). Les seules modifications apportées à la technique originale ont été:

- l'emploi d'une gélose (gélose ordinaire pour bactériologie, mais lavée par percolation à l'eau distillée, pendant 3 jours) à 0,9 %
- l'utilisation de ponts de jonction très courts en gaze imbibée de gélose. Ce montage permet des séparations étalées sur 14cm sous 110 volts aux bornes en 3heures 30 dans la macro-méthode et de 9,5cm en 2 heures dans la semi-micro-méthode.

c) Immuno-électrophorèse modifiée:

1°) Lors de l'emploi d'immun-sérums de poule, la netteté des lignes de précipitation a été améliorée par l'immer-

sion des électrophorèses pendant 30 minutes dans du ClNa à 8 %.

2°) Dans une série d'expériences nous avons modifié divers paramètres:

- a) champs de 12 volts/cm en tampon borate pH 8,9 pendant 60 minutes.
- b) champs de 2 volts/cm en tampon veronal pH 8,2 et ClNa 0,15 M.

3°) Employé des électrodes impolarisables par chloruration lente de fils d'argent pur 10/10, noyés dans un bloc de gélose à 5%, saturée de ClNa (selon Bussard).

II) Réactions d'agglutination de particules sensibilisées.

Nous avons utilisé:

A) Pour la mise en évidence du facteur agglutinant, les réactions d'agglutination 1°) de globules rouges de mouton sensibilisés par l'anticorps de lapin correspondant (réaction de Waaler-Rose classique);

2°) de globules rouges humains O Rh⁻ sensibilisés par un anticorps de lapin homologue (technique de routine extrêmement commode, car évitant l'absorption des hétéro-agglutinines anti-mouton, mise au point au laboratoire d'hématologie et des groupes sanguins de l'Institut Pasteur);

3°) de globules rouges humains O Rh⁺ sensibilisés par un anti Rh incomplet de titre élevé provenant d'un donneur immunisé;

4°) de globules rouges de poule sensibilisés par un anticorps de lapin anti-globules rouges de boeuf (réaction croisée).

L'emploi de ces différents systèmes a été rendu nécessaire pour éliminer l'intervention de phénomènes sérologiques parasites susceptibles d'invalider les résultats expérimentaux obtenus.

Le protocole général a été le suivant:

Les globules rouges recueillis sur citrate ou A.C.D., sont lavés 3 fois en eau physiologique, puis sensibilisés pen-

dant une heure à 37° avec une demi-dose agglutinante, à la concentration de 1%.

Le titrage effectué sous un volume final de 0,4 ml (0,2 ml de globules rouges sensibilisés à 1% et 0,2 ml de la dilution du sérum ou de la préparation à évaluer en facteur agglutinant). Après incubation d'une heure à 37°, la lecture des agglutinats est effectuée au miroir concave. Les sérums de P.C.E. atteignent des titres agglutinants de 1/1.000; pour les témoins sérums normaux le titre est inférieur à 1/10.

B) Pour la mise en évidence du facteur antiglobulinique, les réactions d'agglutination d'hématies ou de particules de latex de polystyrène ayant fixé une globuline gamma humaine, ou animale, purifiée.

Pour la réaction au latex, 0,1 ml de la suspension à 30% sont amenés à 10 ml et sensibilisés par 0,5 ml de globuline gamma humaine à 1% (chauffée pendant 10 minutes à 63°).

Le titrage est également effectué sous 0,4 ml (0,2 + 0,2 ml) et la lecture est faite au miroir concave après séjour de 2 heures au bain-marie à 56° et centrifugation à 2.300 tours pendant 3 minutes.

Les titres obtenus vont de 1/40 (seuil de signification) à 1/2.000.

Il est à remarquer que cette réaction est susceptible de fournir davantage de difficultés expérimentales que la variante utilisant les globules rouges humains, elle paraît parfois plus sensible.

MODIFICATIONS NON SPECIFIQUES

Immuno-électrophorèse selon Grabar et Williams

- a) pH 8,2 en tampon véronal 0,025 M
géluse 0,95 %, champ de 5 volts / cm.
- b) emploi de divers immun-sérums anti-S.H.N.

Description globale des résultats fournis par les immun-sérums employés.

Avec l'I-S de référence anti Sérum Humain Normal de l'Institut Pasteur (lot n° 491: mélange 282 + Coquet), il est possible de mettre en évidence dans chaque échantillon de sérum examiné au moins 25 arcs de précipitation identifiant autant de protéines différentes.

Ce chiffre reste notablement inférieur à celui des espèces protéiques fonctionnellement définies du sérum: facteurs du complément, facteurs de la coagulation, enzymes, etc... cependant la même protéine, immunologiquement homogène peut supporter plusieurs activités et la concentration de fractions sériques combinée à l'emploi d'un mélange d'immun-sérums permet de l'élever encore.

Ceci est surtout vrai pour les zones alpha 1 rapides et les zones alpha 2, alors que dans la zone bêta-gamma où s'est portée notre attention en raison de la localisation des facteurs agglutinant et antiglobulinique, l'emploi de multiples immun-sérums anti-S.H.N. préparés chez la chèvre, la poule, le lapin, le cheval, ne révèle pas de protéines nouvelles (qui ne seraient pas décelées par le mélange 491), sauf 2 bêta qui ne sont pas particulièrement augmentées dans le sérum de P.C.E.

Image immuno-électrophorétique d'un sérum de P.C.E. de titre 1/1.000 à la réaction d'agglutination.

Résultats analytiques

A) zone bêta 2-gamma:

1°) Dès l'abord, il importe de rappeler qu'aux dénominations

de globulines gamma 2 (ou lentes et gamma 1 macro (ou rapides) en électrophorèse en milieu liquide, correspondent respectivement, en immuno-électrophorèse celles de gamma et de bêta 2 macro (bêta 2 M) et en ultra-centrifugation celles de gamma 7 S (ou légère) et 19 S (ou lourde), au moins en première analyse puisque l'ultra-centrifugation ne saurait distinguer entre alpha 2 et bêta 2 macro.

2°) La quantité totale de macroglobulines du S.H.N. (alpha 2 et bêta 2 macro) mesurée par ultra-centrifugation est en moyenne de 3 mg / ml chez l'adulte, varie avec le sexe et l'âge; l'essentiel étant constitué par l'alpha 2 macro (80 %).

Les modifications non spécifiques rencontrées ont été les suivantes:

1°) augmentation des globulines gamma: faible, elle se différencie très nettement des hyperglobulinémies gamma africaines que nous avons pu examiner (et dont les réactions d'agglutination sont entièrement négatives). L'existence d'un trait supplémentaire de gamma, suspect de communauté avec la bêta 2 A, rendu plus visible si l'anti-gamma est mis dans la rigole-anticorps 12 heures après l'électrophorèse. Cet aspect n'est pas rencontré avec diverses préparations de globuline gamma fractionnées selon la méthode de Cohn examinées dans un large éventail de concentrations allant de 0,5 à 40mg/ml (sauf pour le lot "R" qui montre un curieux aspect analogue). Bien que ce trait supplémentaire ne soit pas parallèle au trait gamma principal, et que l'immun-sérum Estelle montre une ligne de précipitation floue, isolée à cet endroit, nous devons le considérer comme un phénomène non spécifique.

2°) Augmentation discrète de la bêta 2 M, qui ne semble pas être corollaire d'une hyperglobulinémie franche (on sait d'ailleurs que gamma et bêta 2 M sont fréquemment dissociés dans leurs variations).

Cette augmentation est liée à la positivité des réactions sérologiques, bien que ne la conditionnant pas: en effet,

elle est retrouvée dans 20 cas sur 42 de P.C.E., dont 4 malades avec réactions d'agglutination négatives: un enfant et 3 adultes (dont un cirrhotique) et chez une spondylarthrite ankylosante avec réaction d'agglutination paradoxalement positive.

Elle existe dans le liquide synovial positif examiné comparativement à un liquide synovial négatif. Elle peut être évaluée à 2 à 3 fois la quantité physiologique (alors que dans les macroglobulinémies, elle va de 20 à 100 fois): i.e; l'arc de bêta 2 M est vu en I-E, avec une quantité de sérum deux à trois fois plus faible dans la cuve antigène.

3°) La bêta 2 A est souvent augmentée, à la différence des macroglobulinémies où elle nous est apparue diminuée corrélativement à l'augmentation de la bêta 2 M.

4°) Augmentation de la bêta 2 que nous avons appelée bêta 2 B; cette augmentation existe aussi bien dans les sérums avec réaction d'agglutination positive que négative; c'est la bêta 2 la plus lente, aussi, selon la quantité relative de bêta 2 A et bêta 2 B, peut-il se produire une image en crochet d'interprétation délicate.

Cette bêta 2 devient extrêmement nette avec l'immun-sérum épuisé par les globulines, bêta 2 A, bêta 2 M; cette observation a le mérite de rappeler que même en I-E, des arcs peuvent se masquer mutuellement (d'où, à notre avis, l'intérêt de la macro-méthode).

5°) Augmentation de la bêta 2 D (nomenclature Burtin-Grabar). Constituant du sérum normal, mal vu dans les conditions habituelles, s'il n'est pas augmenté, il est bien mis en évidence par l'emploi différé combiné de deux I-S, dont le premier ne possède pas l'anticorps correspondant, par exemple 1299 puis 491.

6°) Présence dans un certain nombre de sérums à titre agglutinant élevé surtout d'une bêta 1-bêta 2 (bêta 2 C de la nomenclature Burtin-Grabar), absente des sérums témoins;

cette protéine apparaît sous la forme d'un arc très rectiligne, sans maximum net, recouvrant partiellement les zones bêta 1 et bêta 2, d'où la dénomination proposée. Son identité a été établie au cours de l'enquête sur le facteur agglutinant.

B) Zone bêta 1

1°) La sidérophiline est normale.

2°) La bêta 1 B normale sinon augmentée.

3°) La bêta 1 A normale (parfois légèrement diminuée).

Il s'agit d'une euglobuline (insoluble à pH 5,8 et faible force ionique) qui montre parfois un double arc; l'arc secondaire, né du premier, d'importance variable, semble se "développer" à ses dépens: l'arc principal bêta 1 étant alors diminué d'autant. S'agit-il d'une dénaturation, cet aspect se rencontrant dans les euglobulines, les sérums chauffés ou vieillis, ou, au contraire, d'un rapport antigène / anticorps convenable, puisqu'il est susceptible d'apparaître avec le même échantillon de sérum lors de l'emploi d'immun-sérums de lapins anti-euglobulines ou de certaines dilutions de divers immun-sérums d'équidés.

a) Seligman ayant observé une diminution fréquente de la bêta 1 A définie par le sérum 1299 dans le L.E.D. en période évolutive (l'immun-sérum 1299 reconnaît, au moins pour certaines saignées, jusqu'à 3 bêta 1, avec différents rapports antigène / anticorps, mais essentiellement cette bêta 1 dite A), nous avons recherché la corrélation entre cette bêta 1 A/1299 et les 4 bêta 1 vues par les immun-sérums ayant en commun l'I-S n° 282 (dont le 491).

L'emploi de sérums et d'euglobulines présentant la double courbure d'un arc bêta 1, dans un montage immuno-électrophorétique permettant une réaction d'identité, au cours d'une électrophorèse prolongée (4 heures contre 1 heure 3/4, dans la semi-micro méthode) de façon à accentuer les différences de mobilité a permis d'identifier la bêta 1 A/1299 à la bêta 1 la plus rapide et la plus "interne" (conséquence de la

proposition précédente) des deux bêta 1 principales autres que la sidérophiline reconnues par l'I-S 491.

b) L'évaluation de cette bêta 1 pourrait être utile au diagnostic différentiel L.E.D./P.C.E. puis-que des cellules simulant les cellules de Hargraves existeraient dans un pourcentage notable de P.C.E. et qu'il existe des cas frontière.

Nous avons pu examiner 5 cas considérés comme tels:

Deux présentaient une bêta 1 A très diminuée, une hyperglobulinémie gamma beaucoup plus importante que nos P.C.E. classiques, une bêta 2 M augmentée de manière comparable; des réactions de Heller-Svartz et du latex négatives. Deux des réactions positives dans ces deux épreuves et une bêta 1 A sensiblement normale.

Une bêta 1 A non diminuée et des réactions sérologiques de la P.C.E. négatives.

De plus, deux sérums qui avaient été adressés au laboratoire sous l'étiquette L.E.D. (?), à partir d'arguments cliniques, se sont révélés des macroglobulinémies massives: le premier associant une réaction de Heller-Svartz négative, (1/8) et l'absence de facteur de Hazerick; le second, une réaction de Heller-Svartz positive (1/64), une bêta 1 A très diminuée et la présence d'un facteur de Hazerick puissant.

Ce cas offre l'occasion d'insister sur l'intérêt d'explorations immunologiques multiples et complémentaires, et la nécessité de la confrontation clinique des résultats.

c) L'hypothèse avancée par Seligman et une publication récente concernant la parenté d'une bêta 1 avec le complément, autant que la mobilité établie pour le facteur agglutinant de la P.C.E. en électrophorèse sur gélose (sensiblement bêta 1) ont fait rechercher l'action du chauffage sur cette bêta 1 A: le chauffage à 56° pendant 30 minutes, 45 min, 60 min, 120 min, ainsi que:

1°) Le chauffage à 63° pendant 30 et 60 minutes, ont montré que la bêta 1 A après s'être résolue en deux pics de mobilités opposées, n'était plus caractérisable immuno-

électrophorétiquement, après une heure à 56°, mais qu'elle était immunologiquement conservée, même après deux heures à 56°, puisque le sérum ainsi chauffé épuise totalement l'anti-bêta 1 A de notre I-S 1299 (ainsi que les autres anti corps qu'il renferme).

2°) On a observé une conservation de la mobilité et de l'antigénicité de la bêta 2 M après 120 min à 56° et un affaiblissement de l'arc de cette bêta 2 M après 60 min à 63°. Dans ces conditions, l'activité agglutinante du sérum de P.C.E. est sensiblement diminuée.

3°) Enfin, l'alpha 2 lipo est apparue modifiée dans sa mobilité et dans sa solubilité (diminuée) au cours du chauffage.

4°) A ces bêta 1 principales vues par 491 s'ajoute fréquemment dans le sérum de P.C.E., une bêta 1 courte et assez rectiligne, très proche de la cuve et de nature euglobulinique. Sa mobilité est assez sensiblement superposable à celle de la bêta 1 A.

C) Zone alpha 2

Dans cette zone, il existe incontestablement une forte augmentation, mais la multiplicité des lignes de mobilité très voisines rend l'interprétation analytique semi-quantitative délicate. On dira seulement:

- l'alpha 2 lipo paraît abaissée,
- l'alpha 2 M est augmentée, souvent plus fortement dans les P.C.E. où la sérologie est douteuse ou négative,
- l'haptoglobine est fortement augmentée,
- la céruléoplasmine est augmentée.

D) Zone alpha 1-albumine

Le séro-mucoïde est fortement augmenté,

L'albumine est sensiblement normale, seulement diminuée dans quelques cas.

La fraction ρ n'est visible qu'après concentration du

sérum; cette concentration fait apparaître de nombreuses alpha 1 rapides ainsi que 2 alpha 2 au moins, ceci montre bien les limites de notre analyse qui apparaît ainsi susceptible d'être améliorée, et compliquée.

E) Certains sérums, ou les fractions euglobuliniques de ces sérums, ont montré des prolongements de l'albumine et de certaines alpha 2 jusque dans la zone bêta 1 ayant pu faire croire à l'existence du bêta 1 supplémentaires; de tels aspects ont été rapportés à une dénaturation partielle.

Bilan de ces modifications

En conclusion, le sérum de malades atteints de P.C.E. ou de spondylarthrite présente des modifications évocatrices des réactions inflammatoires chroniques, mais moins accentuées qu'il n'était escompté a priori et qui ne permettent pas le diagnostic différentiel: P.C.E. - spondylarthrite. Ce résultat peut ressortir: 1°) soit à l'action correctrice sur le protéinogramme des corticomimétiques anti-inflammatoires dans la zone bêta-gamma, ne laissant subsister que l'augmentation des alpha 2 où l'interprétation est plus délicate;

2°) soit à la difficulté de l'interprétation quantitative de l'I-E. Une tentative pour évaluer avec précision des antigènes par la méthode immuno-électrophorétique a été faite, mais elle ne peut être appliquée qu'à des couples antigène-anticorps dont les mobilités apparentes sont sensiblement identiques et de signe contraire. L'immuno-électrophorèse, en permettant la création d'une batterie d'I-S "monovalents" autorise une évaluation immunochimique analytique précise d'un mélange complexe d'antigènes solubles, par diffusion double en gélose avec des concentrations très rapprochées de l'antigène.

MODIFICATIONS SPECIFIQUES:

IDENTIFICATION DES FACTEURS AGGLUTINANT ET
ANTIGLOBULINIQUE

Mobilité électrophorétique des facteurs agglutinant et antiglobulinique.

L'électrophorèse du sérum, ou des euglobulines concentrées, terminée, la gélose est découpée en bandes étroites de 3mm et la séparation gélose-tampon est obtenue par congélation (à -40°) -décongélation (à 37°) brusques suivie de centrifugation rapide. Dans le même liquide d'élution, on a évalué:

a) l'activité agglutinante vis-à-vis de divers systèmes sensibilisés par l'anticorps correspondant: globules rouges humains ou globules rouges de mouton; débutant juste avant la cuve de départ, elle est maximum dans la cuve ou à son voisinage immédiat côté globulines gamma et décroît rapidement sur 1,5 cm environ, soit une mobilité bêta 1.

b) L'activité antiglobulinique à l'égard de particules de latex sensibilisées par une globuline gamma humaine purifiée; elle est retrouvée dans une large zone dépassant la zone bêta 1, à la fois du côté alpha 2 et bêta 2, avec, au cours de certaines manipulations, une image à deux pics d'activité évoquant une distribution hétérogène.

Dans le cas du facteur, cette mobilité bêta 1, ou mieux, cette "absence de mobilité" bêta 1 n'est, a priori, pas suspecte car les bêta 1 sont réputées contenir les plus grosses molécules du sérum ($P.M.10^6$); de plus, elle a été immédiatement rapprochée de celle présentée par les macroglobulines anormales; elle a été constamment retrouvée au cours d'une vingtaine de déterminations utilisant soit un sérum de titre élevé, soit des euglobulines concentrées; tout au plus a-t-on pu mettre en évidence le facteur agglutinant sur 2,5 cm, côté globulines gamma en augmentant la séparation et en perfectionnant l'élution (mais l'arc de bêta 2 M s'étend alors sur 4,5 cm côté gamma, à partir de la cuve de départ et le maximum reste immédiatement accolé à

cette dernière). Enfin, il est à remarquer que la mobilité "gamma rapide" attribuée par Kunkel au facteur contenu dans le sérum ou ultra-centrifugé, est en réalité une immobilité, le maximum d'activité étant au contact du point de départ.

Dans le cas du facteur antiglobulinique, la répétition du découpage-élution a permis de conclure à une mobilité sensiblement identique aux erreurs expérimentales et à la sensibilité des deux réactions près; les maximum coïncidant entre eux et avec les premiers millimètres après la cuve côté gamma, bien que l'agglutination des particules de latex s'étende au-delà de celle des globules rouges sensibilisés, particulièrement vers la zone alpha 2 qu'elle couvre presque complètement.

Etude des euglobulines.

A l'aide de divers immun-sérums anti S.H.N., on a recherché la présence ou l'augmentation significative d'un arc de précipitation, satisfaisant aux trois conditions:

- 1°) corrélation avec la positivité de la réaction de Heller-Svartz;
- 2°) mobilité environ bêta 1;
- 3°) nature "euglobuline".

A) Comparaison des euglobulines "brutes" fournies par des sérums possédant ou non le facteur agglutinant: précipitation à pH 5,8 et faible force ionique suivie de lavage dans le tampon de dialyse.

a) Image globale

Ces euglobulines contiennent toute l'activité agglutinante du sérum de départ; concentrées jusqu'à 20 fois, dans le but d'éviter un défaut quantitatif d'antigène, elles permettent d'obtenir un titre de 1/5.000 à la réaction de

Heller-Svartz, malgré une certaine insolubilité; ainsi concentrées, elles contiennent, à l'état de traces, la quasi totalité des protéines du sérum y compris l'albumine, mais on peut noter, outre les globulines gamma en quantité importante:

- 1°) un enrichissement net en bêta 2 M,
- 2°) la présence de la bêta 1 décrite en 4°,
- 3°) la présence d'une bêta 1-bêta 2 et d'une alpha 2, absentes des euglobulines normales concentrées de la même façon.

b) Rôle possible de la bêta 1/4

Cette bêta apparaît dans les euglobulines, l'anticorps correspondant n'est pas absorbé par le surnageant de ces euglobulines, sa mobilité, bien que davantage alpha 2, peut être rapprochée de celle du facteur agglutinant. Mais l'anticorps correspondant est épuisé par une quantité sensiblement égale de sérum humain normal ou de sérum de P.C.E. Cette bêta 1 est d'ailleurs visible avec des S.H. à réaction de Heller-Svartz négative.

L'absorption du facteur agglutinant ne fait pas disparaître cette ligne de précipitation. Dans ce cas, on a noté une modification de la mobilité de la bêta 2 M qui a paru amputée de sa fraction rapide voisine de la cuve de départ, mais ceci n'a pu être considéré comme significatif, du fait de la présence d'une petite quantité d'hémoglobine libre (qui a une mobilité environ bêta 1 et perturbe l'immuno-électrophorèse).

c) Identification de la bêta 1-bêta 2 supplémentaire.

Beaucoup plus intéressant est cet arc de précipitation, déjà vu dans certains sérums fortement positifs et retrouvé dans les euglobulines (non concentrées) de ces mêmes sérums; ligne de précipitation fine, sans maximum net, prenant son départ dans la cuve, elle partage avec le facteur agglutinant: sa mobilité, sa nature euglobulinique, sa présence dans des sérums de malade montrant un titre élevé.

Cependant, elle a pu être identifiée, non au facteur, mais à la C. réactive protéine (C.R.P.)

En effet:

1°) Cette ligne ne disparaît pas d'un sérum positif en Heller-Svartz au 1/1.000 épuisé en facteur agglutinant par un culot d'hématics sensibilisées. Elle peut être absente de sérums titrant jusqu'à 1/512 (80 % des P.C.E. sont des C.R.P.+). On la rencontre dans des sérums négatifs au 1/4 en H-S et positifs au 1/100 en ring-test en C.R.P. (la quantité de C.R.P. détectable est comprise entre 2 et 300 γ /ml). Elle est absente des globulines, 33 % titrant 1/1.000 en H-S (classiquement la C.R.P. ne précipite pas dans ces conditions),

2°) Les divers immun-sérums (anti-S.H.N.) qui la montrent, absorbés par le sérum de cordon ou le S.H.N., conservant un anticorps fournissant une image d'identité complète avec deux anti-C.R.P., l'un commercial, l'autre préparé par le Docteur Seligman (que nous remercions ici). Incidemment, ceci pose le problème de l'origine de cet anti C.R.P.

Deux hypothèses peuvent être envisagées:

1°) présence de C.R.P. en quantité antigénique, mais non décelable dans le sérum vraiment normal (i.e, en l'absence de toute agression même minime) les arguments étant: d'une part, la révélation de C.R.P. dans les euglobulines concentrées de sérums C.R.P.-négatifs quand examinés directement; la rapidité de l'apparition de la C.R.P. lors de certains traumatismes tissulaires, d'autre part, le décalage constant entre les résultats des examens immuno-électrophorétiques des préparations "pures" de protéines, même en utilisant la technique de l'épaissement par un énorme excès du constituant pur (ou plus exactement, dans notre proposition, majeur) et les résultats de l'immunisation des animaux avec ce même matériel.

2°) Emploi pour l'immunisation de sérum humain dit

normal, mais contenant du fait de l'utilisation de mélanges non sélectionnés, des quantités importantes de C.R.P. Si on recherche la C.R.P. par ring-test dans le sérum de donneurs sains habituels, il n'est pas rare de trouver des sérums fortement positifs; d'où une désaffection justifiée pour cet examen.

B) Comparaison des euglobulines purifiées, donnant ou non une réaction de H-S positive.

Après trois à cinq précipitations successives à pH 5,8 et faible force ionique, à $+4^{\circ}$, on obtient un matériel qui, gardant l'essentiel de l'activité agglutinante du sérum employé (titre supérieur à 1/512), est alors assez purifié puisque, même après concentration, il montre, examiné en I-E:

a) Pour les euglobulines provenant d'un sérum de P.C.E., et concentrées: la présence de globulines gamma, de bêta 2 M en quantité importante, d'une bêta 1-bêta 2 et d'une alpha 2, en quantité importante également.

b) Pour les euglobulines provenant d'un sérum normal et concentrées de la même façon (titre agglutinant: 1/32, on voit apparaître ici la notion d'une différence, en apparence, seulement quantitative entre normal et P.C.E.): la présence de gamma (en quantité beaucoup plus faible), de la même bêta 1-bêta 2, de cette même alpha 2, mais en quantité plus faible. La bêta 2 M est devinée, mais ne peut être affirmée.

L'épuisement de l'I-S anti S.H.N. par ces euglobulines, en grand excès, confirme les arcs décrits, en particulier la présence d'une très faible quantité de bêta 2 M dans les euglobulines normales (dont le titre concentré atteint 1/32).

De plus, l'anti-bêta 1.A est également absorbé, alors que la bêta 1.A n'a pas été vue à l'examen direct.

C) Etude du surnageant des euglobulines.

Le surnageant des euglobulines préparées à partir de sérum de P.C.E. ou de sérum normal, concentré 4 fois montre la présence de bêta 2 M, alors qu'il est pratiquement privé de facteur agglutinant: titre du sérum avant dialyse: 1/512; titre du surnageant concentré 4 fois: 1/4.

Donc, une partie seulement de la bêta 2 M précipite avec les euglobulines, accompagnant une petite quantité de globulines gamma et certaines protéines bêta 1 et alpha 2, en quantités décelables.

D) Facteur agglutinant et macroglobulinémies.

La relation apparente entre quantité de bêta 2 macrocuglobulines et activité agglutinante, a fait rechercher des affections non rhumatismales avec macroglobulines:

1°) 7 macroglobulinémies européennes ont fourni des titres de 1/8, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/64, 1/128 et, cependant, la quantité de macrocuglobulines pour certaines était énorme, donnant une image caractéristique en double arc et une précipitation massive dans la cuve de départ.

2°) 9 macroglobulinémies réactionnelles d'Africains noirs (taux de macroglobuline compris entre 12 et 30 %) ont fourni des résultats significatifs dans 3 cas de 1/64, 1/128 et 1/256; dans ces cas, au contraire, la macroglobuline comporte relativement peu de macrocuglobuline précipitant à pH 8,2 et l'image immuno-électrophorétique de ces sérums, positifs en Heller-Svartz, est tout-à-fait différente de celle des cas européens. On voit donc qu'à des quantités importantes de macrocuglobuline ne correspondent que des titres d'activité agglutinante faibles (ou nuls) et que le facteur agglutinant ne peut être tenu pour synonyme, ni de bêta 2 M dans sa totalité, ni de bêta 2 M euglobuline.

E) Epuisement des euglobulines de P.C.E. par un culot de G.R. sensibilisés.

Les euglobulines, trois fois précipitées, provenant d'un sérum de P.C.E. riche en facteur agglutinant, ont été incubées à 37°, au contact de globules rouges humains sensibilisés par l'anticorps de lapin correspondant, provoquant leur agglutination; après centrifugation, le surnageant, dont on s'est assuré qu'il était dorénavant privé de facteur agglutinant, a été examiné en I-E: ce qui a montré une diminution de la quantité de bêta 2 M présente, mais non comme il était escompté sa disparition complète. Ce résultat peut recevoir comme explication le fait que nous avons négligé d'épuiser également par un système comportant de la gamma globuline humaine chauffée à 63°, considérant que les facteurs antiglobulinique et agglutinant étaient soustraits par épuisement avec l'un ou l'autre des deux systèmes, ou encore, que même dans un sérum de P.C.E., le facteur spécifique ne s'identifie pas à la totalité des bêta 2 macroeuglobulines.

Conclusions:

La comparaison entre euglobulines purifiées de sérum normal et de sérum de P.C.E. montre une quantité de bêta 2 macroeuglobuline en rapport avec le titre agglutinant. L'examen de macroglobulinémies européennes ou africaines et l'épuisement en facteur agglutinant des euglobulines de P.C.E. indiquent que facteur agglutinant n'est pas synonyme de bêta 2 macroeuglobuline.

L'arc de précipitation faussement caractéristique des sérums de P.C.E. a pu être identifié à la C-Protéine Réactive.

Identification du facteur agglutinant

A) Epuisement de l'immun-sérum anti S.H.N. (lot 491)
par le facteur agglutinant (+ protéine X) fixé sur des globules rouges sensibilisés; ce qui correspond à sa définition même, mais ne saurait prétendre limiter au facteur agglutinant, les protéines "spécifiquement" fixées.

a) Protocole général

1°) Le facteur agglutinant contenu dans 3ml de sérum de P.C.E. titrant 1/1.000 à la réaction de Heller-Svartz, a été fixé dans sa totalité sur 30ml de culot de globules rouges humains O Rh négatifs sensibilisés par 1ml d'un immun-sérum de lapin anti-globules rouges humains de titre agglutinant 1/1.600. La disparition complète de toute activité agglutinante dans le surnageant d'épuisement a été soigneusement vérifiée.

2°) Le culot de globules rouges sensibilisés ayant fixé le facteur agglutinant, a été lavé 10 fois dans 4 volumes de tampon isotonique.

3°) 0,75 ml de L'I-S 491, dilué pour éviter au maximum les pertes mécaniques, ont été épuisés par ce culot. L'I-S absorbé a été ensuite reconcentré.

4°) L'I-S ainsi absorbé a été confronté en I-E, vis-à-vis de sérum humain normal et de sérum de P.C.E., aux témoins obligatoires réalisés dans des conditions strictement identiques.

b) Résultats

Nous les schématisons ainsi: soit D un sérum de P.C.E. positif titrant 1/1.024 à la réaction de Heller-Svartz et d un sérum (de P.C.E.) négatif Heller-Svartz (ainsi qu'en latex)

1°) $491 = 491 + [GR] = 491 + [GRS] = 491 + [GR + SHN] =$
aucune disparition par rapport à 491

2°) $491 / [D. + GR] =$ consommation d'anti α et
partielle d'anti. β 2 A

3°) $491 / [D. + GRS] =$ consommation d'anti α , et
partielle d'anti β 2 A
mais disparition de l'anti bêta 2 M

4°) $491 / [d + GR] = 491 + [d + GRS] = 491$

c) Interprétation de ces résultats

La fixation du facteur agglutinant apparaît donc superposable à celle de la bêta 2 macroglobuline.

I) On remarquera que le sérum D donne une consommation de l'antiglobuline gamma quand incubé en présence de globules rouges humains normaux O Rh non sensibilisés, ceci malgré une réaction indirecte de Coombs négative (nous n'avons pas pratiqué de réaction de Cloeson-White et Hall). La réaction directe de Coombs, pratiquée sur les globules rouges de D est légèrement positive (avec l'I-S antiglobuline humaine Estelle, seulement) et le reste après 10 lavages (à la différence de certaines réactions faussement positives qui s'annulent après le 6ème lavage); on sait d'ailleurs que dans un faible pourcentage de P.C.E. [], on rencontre une réaction de Coombs positive. Ce qui est important c'est que cet état "sensibilisé" des globules rouges D,

1°) ne les rend pas agglutinables par le facteur puissant contenu dans le sérum D (D n'agglutine pas les hématies O Rh + sensibilisées par un anti Rh humain (i.e; par une gamma humaine);

2°) ne modifie pas leur réactivité après sensibilisation par l'I-S de lapin pour la mise en évidence du facteur agglutinant présent dans ce même sérum D (ou d'autres sérums de P.C.E.)

II) Le caractère significatif de la bêta 2 M mise en évidence dans le système: (sérum P.C.E. E-S positif + G.R.S) a été confirmé par deux expériences:

a) dans la première, 2 fois 30ml de culot de globules rouges humains du groupe O Rh+, ont été sensibilisés par 10ml de sérum humain contenant un anti-C+D, incomplet, provenant d'un sujet immunisé. Ces G.R.S. ont été incubés en pré-

sence de 20ml de sérum constitué par un mélange de 7 sérums de P.C.E. de titre 1/128 en Heller-Svartz dont le facteur agglutinant était incapable d'agglutiner au 1/5 ce système sensibilisé; l'absence de fixation du facteur sur ce système a été vérifié: titre, inchangé en H-S, après l'incubation à 37° en présence du culot d'hématies 0 Rh+ sensibilisées par l'anti Rh.

Résultats:

- 1°) $491 + G.R.O^+ = 491 = i.e.$ pas de différence avec le témoin, donc lavage des hématies humaines satisfaisant
- 2°) $491 + (G.R.O^+ + \text{anti-Rh humain}) =$ consommation de l'anti gamma
- 3°) $491 + (G.R.O^+ + \text{anti-Rh humain}) + S.P.C.E.) =$
 - 1) consommation de l'anti-gamma
 - 2) pas de consommation de l'anti-bêta 2 macroglobuline.

Ceci montre que: 1°) l'anti-Rh est bien une globuline gamma, 2°) dans un système immunologique de G.R. sensibilisés où l'anticorps ne permet pas la mise en évidence du facteur agglutinant, il n'y a pas fixation de la bêta 2 M.

b) Dans la seconde, on a employé 2 fois 40 ml de culot de G.R. humains 0⁻ sensibilisés par l'immun-sérum de lapin qui ont été incubés en présence de 140ml de sérum humain normal (titre en Heller-Svartz inférieur à 1/5)

Résultats:

- 1°) $491 + G.R.S. = 491$
- 2°) $491 + (G.R.S. + 140ml \text{ de S.H.N.}) =$
 - 1) consommation d'anti gamma
 - 2) pas de consommation de l'anti-bêta 2 M

Il y a eu après mise au contact du S.H.N. avec les G.R.S., 10 lavages au total dans un grand volume d'eau physiologique et le témoin ayant subi ce même nombre de lavages (10) n'a

épuisé aucun anticorps de l'I-S 491. La présence de globuline gamma sur les hématies sensibilisées ne peut être expliquée que par un hétéro-anticorps anti-lapin, différent du facteur agglutinant.

Note: La différence entre ce résultat et celui décrit plus haut s'explique par l'importante différence entre les quantités de sérum non agglutinant employées: 3 ml la première fois, 140ml la deuxième, soit plus de 50 fois plus (la quantité d'immun-sérum anti-S.H.N. épuisée la seconde fois ayant été plus faible).

B) Dissociation-élution à partir de globules rouges humains sensibilisés.

But: confirmer le rôle déterminant de la bêta 2 M dans l'agglutination des hématies sensibilisées, mais surtout vérifier la participation de cofacteurs dans la zone alpha 2.

Choix du système sensibilisé

Les divers systèmes de globules rouges sensibilisés conviennent également, a priori, à la préparation d'un éluat; mais, d'une part, les globules rouges animaux nécessitent, sauf artifice, une absorption préalable des hétéro-agglutinines, d'autre part, les globules rouges frais libèrent, au cours de l'élution, de l'hémoglobine (+ protéines X) suspecte de modifier les mobilités électrophorétiques dans la zone bêta, en gélose, la même objection vaut pour les stroma dont la manipulation est difficile si l'on désire laver de grosses quantités, un nombre considérable de fois. Aussi, avons nous obtenu les meilleurs résultats avec des globules rouges humains formolés dont les propriétés de résistance à la chaleur (110°), au pH, à la tonicité (pas d'hémolyse en eau distillée), sont assez extraordinaires alors qu'ils conservent assez bien leur antigénicité globale et qu'ils contrifugent avec la plus grande facilité.

Protocole

- 1°) Globules rouges humains 0 Rh- recueillis sur solution A.C.D.
- 2°) Formolage: deux traitements à 37° par le formol à 20 %
- 3°) 5 lavages
- 4°) Sensibilisation par l'immun-sérum de lapin correspondant.
- 5°) Fixation du facteur: 2,5 ml de sérum de titre 1/1.000 pour 20ml de culot (il y a fixation sans agglutination en masse comparable à celle rencontrée avec les globules rouges frais).
- 6°) Elution: a) par un tampon phosphate de pH 5,5
b) par l'urée 6 M puis 4 M.
- 7°) Dialyse de l'urée.
- 8°) Eventuellement concentration de l'éluat par précipitation à pH 5,5 et faible force ionique
- 9°) Etude de l'éluat.

Résultats

1°) L'éluat par le tampon acide est d'un rendement très faible, même si l'activité spécifique (rapport du nombre d'unités agglutinantes / quantité totale de protéines) est élevée, aussi l'avons-nous écartée.

2°) L'éluat par l'urée nous a fourni avec un rendement satisfaisant, un éluat actif.

Etude sérologique

Activité antiglobulinique (évaluée en latex): positive

Activité agglutinante: en Heller-Svatz avec des globules rouges humains elle est très forte, mais il y a agglutination des globules rouges témoins non sensibilisés.

Interprétation: il y a eu élution de l'anticorps de lapin anti-G.R.

- en Waaler-Rose (mouton), l'éluat reste aussi actif, sinon davantage, mais il n'agglutine plus les hématies non sen-

sibilisées (les titres anti-mouton sont généralement plus élevés)

Etude en précipitation

Précipitation interfaciale: lapin anti-S.H.N. + éluat = positif; donc protéine homme (sous réserve d'allotypie)

bouc anti-lapin (épuisé S.H.N.) + éluat = positif; donc protéine lapin.

Immuno-électrophorèse

L'emploi de deux immun-sérums) anti-S.H.N. (491)
(anti-sérum de lapin normal
(bouc)

a montré avec :

1°) l'anti-S.H.N. une alpha 2 (en grande quantité)
la bêta 2 M et les gamma globulines.

L'identité bêta 2 M a été contrôlée par l'emploi d'un immun-sérum anti-bêta 2 M.

2°) avec l'immun-sérum de bouc:

la présence de gamma de lapin.

Nous avons vérifié que l'immun-sérum anti-S.H.N. n'était pas anti-gamma de lapin et vice-versa; ils mettent réciproquement en évidence des motifs antigéniques communs à l'albumine, et à certaines alpha 1 et alpha 2.

Note: On a écarté l'hypothèse selon laquelle cette alpha 2 serait une alpha 2 de lapin mise en évidence (par communauté antigénique) par les immun-sérums anti-S.H.N et pas décelées par le bouc anti-lapin, par les résultats de l'immunisation de lapins avec ce complexe (G.R.S. + facteur + X)

Conclusions

Un point important a été acquis, au cours des trois essais effectués:

La quantité de bêta 2 M révélée en I-E dans l'éluat est apparue proportionnelle au titre agglutinant anti-mouton de

cet éluat: 200 à 250 unités agglutinantes étant nécessaires à la mise en évidence d'un arc bêta 2 M.

En résumé: l'épuisement d'un I-S anti-S.H.N. par des culots de globules rouges humains sensibilisés ayant fixé le facteur agglutinant, ainsi que l'élution de ce facteur à partir de ces globules rouges sensibilisés permettent d'identifier le facteur agglutinant à une bêta 2 macroglobuline. Une alpha 2 se fixe également sur les hématies sensibilisées mais: 1°) elle ne sembla pas nécessaire à l'agglutination comme le montrent les découpages des électrophorèses de sérums de P.C.E.; 2°) elle se fixe également en l'absence de bêta 2 M en quantité décelable avec le sérum normal.

Identification du facteur antiglobulinique

A) Epuisement de l'I-S 282 par le facteur (+ protéines X) fixé sur latex sensibilisé par une globuline gamma humaine purifiée.

a) Protocole

La totalité du facteur antiglobulinique contenu dans 5 ml de sérum de P.C.E., positif en Heller-Svartz, comme en latex, a été fixé sur 1ml d'une suspension à 30 % de particules de latex (de 0,8 micron de diamètre en moyenne) sensibilisées par 10mg de globuline gamma humaine, chauffée à 63° pendant 10 minutes.

Les particules de latex ont alors été lavées 4 fois dans le tampon glycocolle 8,2 et ont servi à épuiser 0,4 ml de l'I-S anti-S.H.N.282 (on a vérifié que le facteur ne s'élueait pas au lavage après s'être fixé).

b) résultats

282 + (latex S + S P.C.E.) = consommation des anti-bêta 2 A, bêta 2 M, gamma et bêta 1 A.

282 + (latex non S) = 282

mais,

282 + (latex S + S.H.N.) = consommation anti bêta 2 A et M, gamma et bêta 1 A

282 + (latex S) = consommation des anti bêta 2 A et

M et gamma.

Donc pas de conclusion possible à tirer de cette expérience, sinon que les impuretés bêta 2 A et bêta 2 M contenues dans 25 mg de globulines gamma du lot utilisé suffisent à épuiser 1 ml de notre I-S.

Aussi a-t-on répété l'expérience avec du latex non sensibilisé.

B) Epuisement de l'I-S 282 avec le facteur (+ protéine X) fixé sur latex non sensibilisé.

En effet, un certain nombre de sérums de titre élevé surtout, de l'ordre de 5 % dans la statistique du Laboratoire d'Hématologie et des Groupes Sanguins de l'Institut Pasteur, mais éminemment variable selon les laboratoires: (jusqu'à 50 %) agglutinent les particules de latex non sensibilisées (ainsi que d'autres particules).

Ceci est interprété comme résultant de la présence (ou mieux de la création, par "étalement") de la "globuline gamma à motif reconnu par le facteur" dans le propre sérum du malade.

a) Protocole

Un ml d'un sérum de ce type (D) et un sérum de P.C.E négatif en latex (d) ont été incubés 2 heures à 56° en présence de latex non sensibilisé; le latex lavé 4 fois en tampon glycocolle, pH 8,2 et 0,2 M a servi à épuiser 0,5 ml de l'I-S 282. On a vérifié que le sérum positif avait été privé de facteur antiglobulinique et agglutinant dans sa totalité, par cette incubation en présence de latex non sensibilisé.

Résultats:

Dans la zone bêta-gamma qui nous intéresse, en raison de la localisation du facteur spécifique de la P.C.E., on a enregistré la consommation des anticorps anti-gamma, bêta 2 M et A, et bêta 1 A (sans préjudice de la fixation d'autres protéines dans les zones alpha, non explorées, comme nous le verrons au chapitre immunisations) aussi bien avec

le sérum positif que négatif. Ce résultat, s'il est en concordance avec les précédents (fixation non spécifique de bêta 2 A et M et de gamma), ne présente pas d'"élément différentiel au sérum positif et négatif.

Aussi, des quantités décroissantes de [latex non sensibilisé + sérum positif]

[latex non sensibilisé + sérum négatif]

ont elles été employées pour épuiser une quantité fixe d'un mélange d'I-S: 1299 + 282.

Dans ces conditions, on a pu établir que jusqu'à la quantité de protéines que fixent sur le latex 0,15ml de sérum normal ou de sérum de P.C.E., il y a épuisement complet des anticorps anti-gamma et anti-bêta 2 A contenus dans 1 ml de mélange ââ 1 299-282.

Par contre, il faut une quantité de sérum négatif double de celle de sérum positif pour épuiser totalement l'anti bêta 2 M.

D'autre part, nous avons étudié avec l' I-S anti S.H.N. le surnageant du latex non sensibilisé, ramené à son volume initial:

a) soit directement: avec les immun-sérums 1299 et 491, on y voit une dizaine de lignes de précipitation y compris la bêta 2 M et les gamma, mais pas d'alpha 2 M;

b) soit par épuisement: (un volume d'I-S par un volume égal de sérum humain traité par le latex); après avoir vérifié que dans ces conditions l'épuisement était total avec 1/2 volume de ce même sérum de P.C.E. non épuisé par le latex (quand examiné contre ce sérum lui-même).

Il reste alors de nombreux anticorps: un anti bêta 2 et 5 anti alpha 2, dont l'anti alpha 2 M, ce qui montre bien que le latex fixe en quantité importante et sans aucune spécificité de nombreuses protéines du sérum. L'explication peut en être trouvée dans le fait que, dans les conditions opératoires décrites, 0,2 ml de sérum sont "étales" à la surface de plus d'un mètre carré de particules.

ELUTION DU FACTEUR ANTIGLOBULINIQUE

A partir de globulines gamma humaines.

Préparation

Un éluat ayant une activité double agglutinante et antiglobulinique a été préparé à partir de globulines gamma humaines (fraction II de Cohn) agrégées par chauffage à 73° à la concentration de 35mg / ml.

Le schéma suivant a été suivi:

F II, 73°, une minute environ (500mg)

3 lavages en eau physiologique

1 lavage dans l'urée 4 M

3 lavages dans le glyocolle pH 8,2 et 0,2 M

Mise au contact pendant 1 heure à 37°, puis 2 heures à + 4° avec un sérum ou des euglobulines de P.C.E., riche en facteur antiglobulinique, sous agitation magnétique continue,

4 lavages en glyocolle pH 8,2

2 lavages urée 4 M

dialyse de l'urée contre le tampon glyocolle, puis le tampon à I-E

précipitation éventuelle sous forme d'euglobulines de l'éluat et reprise dans le tampon glyocolle 8,2.

Résultats sérologiques

L'épuisement en facteur du sérum (des globulines, ou des euglobulines est presque total quand évalué par la réaction de Heller-Svartz (90 %-95 % environ)

L'éluat possède une activité agglutinante et anti-globulinique. Mais le rendement est faible. Deux explications ont pu être apportées à la perte importante en facteur au cours de la manipulation:

I') apparition d'une précipitation spontanée au cours de la dialyse de l'urée.

a) La consommation de l'anti-S.H.N. par ce précipité soigneusement lavé dans le tampon glyocolle a montré

qu'il était composé de bêta 2 M et de gamma globuline (on n'a pas envisagé l'éventualité de la participation d'une alpha 2).

b) Des deux hypothèses pouvant rendre compte de sa formation: dénaturation par urée ou précipité immunologique bêta 2 M-anti gamma, cette dernière est valorisée par :
1°) l'absence de précipité dans un sérum de P.C.E. traité par l'urée 8 M à volume égal, au cours de la dialyse de l'urée, sans perte d'activité sérologique et sans modifications immuno-électrophorétiques; 2°) la composition identique du précipité lorsqu'on emploie une globuline gamma de porc au lieu de globuline gamma humaine pour la fixation-élution (rappelons que l'I-S anti-S.H.N ne "voit" ni la gamma, ni la bêta 2 M de porc); 3°) l'obtention d'un précipité fluorescent lorsqu'on a utilisé un sérum de P.C.E. marqué avec un colorant fluorescent, la lissamine rhodamine.

II) Absence de dissociation complète du facteur anti-globulinique à partir de la gamma agrégée au cours de deux lavages par l'urée 4 M; ce que montre la comparaison entre l'épuisement de l'I-S anti-S.H.N. par la gamma agrégée seule (pas de consommation de l'anti bêta 2 M) et par la gamma agrégée ayant fixé le facteur après lavage dans l'urée 4 M (consommation de l'anti bêta 2 M)

Résultats immuno-électrophorétiques

1°) L'éluat obtenu a montré deux lignes de précipitation identifiées à celles de la bêta 2 M et des globulines gamma.

Ceci par l'emploi d'I-S épuisés par les globulines gamma, un mélange bêta 2 M + gamma (à l'état d'impureté), du sang de cordon ainsi que par l'emploi d'un I-S anti-bêta 2 M + gamma seulement.

2°) Lors de la mise dans la cuve de départ d'une grosse quantité de cet éluat, très concentré, on a rencontré une troisième ligne de précipitation de mobilité bêta 2 également à peine visible, qui a été identifiée à la bêta 2 A par l'u-

tilisation de l'I-S 1299 et l'épuisement de 491.

On a remarqué que la mobilité de la globuline gamma éluée était légèrement plus rapide que celle des gamma normales, sans que ceci puisse être attribué à l'action de l'urée.

Critique

1°) Si la globuline gamma (lot 606 de Squibb) apparaît immuno-électrophorétiquement homogène aux concentrations de 6, 12 et 24 mg / ml.

2°) Si à la quantité de 1mg / ml d'I-S 491, elle n'épuise que l'anti-gamma.

3°) Si agrégée à 73°, elle n'absorbe que l'anti-gamma; et ceci partiellement du fait de la dénaturation corollaire de l'agrégation.

4°) Si enfin le témoin, lavage urée de la gamma agrégée ne montre que des traces de globuline gamma, invisibles en I-E sauf artifice .

Cependant, la globuline gamma 606 examinée en I-E à la concentration de 40mg / ml montre des traces de bêta 2 A et M et même d'albumine. De nombreuses autres préparations, provenant d'autres sources, sont encore beaucoup plus hétérogènes (c'est le cas de celles employées dans l'étude du facteur fixé sur latex) jusqu'à 6 impuretés en double diffusion. La bêta 2 M, qui forme environ 10 % des "gamma" totales, devrait à sa teneur élevée en carbohydrates son absence presque complète de la fraction II de Cohn (elle précipite essentiellement dans la fraction III).

Toutefois, un très important argument en faveur de l'identité bêta 2 macroglobuline a été tiré de plusieurs découpages-élution de l'électrophorèse de l'éluat des globulines gamma agrégées: l'activité agglutinante (l'activité anti-globulinaire jugée, superposable, n'a pas été recherchée) est apparue strictement limitée à la totalité de la ligne de préci-

pitation de la bêta 2 M, les maximums coïncidant exactement. Ceci au cours de plusieurs essais, y compris l'un où une faute technique a entraîné une modification importante de la mobilité de la bêta 2 M (une partie seulement de l'électrophorèse est chaque fois découpée, la partie centrale, de façon à pouvoir évaluer avec précision la corrélation: arc de précipitation/activité). Ce résultat est différent de celui obtenu avec le sérum total qui a fourni l'éluat, au cours d'une même manipulation; d'ailleurs, ce même éluat, bien que concentré et plus actif, ne montre pas d'image de précipitation spontanée.

En conclusion, dans le cas du facteur antiglobulinique qui, d'ailleurs est agglutinant, la bêta 2 M semble également être en cause.

ORIGINE ET SIGNIFICATION DES PROTEINES MISES EN EVIDENCE

I) Immuno-électrophorèse en fluorescence

L'expérience décrite a été répétée après marquage de l'un des deux éléments: euglobulines de P.C.E. ou globulines gamma humaines-réactif à l'aide d'un colorant fluorescent, la lissamine-rhodamine (utilisé sous forme de chlorure d'acide).

A) Marquage des euglobulines actives en Heller-Svartz.

Le marquage a été vérifié: 1°) en recherchant l'agglutination des particules de latex qui a montré des agglutinats de particules fluorescentes après 10 lavages dans 5ml de tampon glyccolle pH 8,2; la quantité de latex étant de l'ordre de 0,003 ml.

2°) En réalisant l'immuno-électrophorèse du matériel fluorescent obtenu; celui-ci a montré les constituants déjà décrits des euglobulines de P.C.E., essentiellement 1 alpha 2, les gamma et la bêta 2 M sous forme de traits de précipitations fortement fluorescents.

Remarques:

a) des clichés en fluorescence (Service de microphotographie, M. Monigault - Institut Pasteur) peuvent être obtenus en utilisant comme source une lampe HB O 200, munie d'un filtre bleu, située à 80cm environ, sous une incidence de 30° avec un objectif macrokilar, portant un filtre Wratten 15 et chargé avec un film Panchro (durée de pose: 15 sec.)

B) Une application intéressante du marquage des I-S (et non plus des antigènes) utilisés en immuno-électrophorèse réside dans l'identification des arcs montrés par un immun-sérum à ceux montrés par un autre I-S de référence; ex.: 1299 et X). Une amélioration peut être apportée à la méthode grâce à l'emploi de deux conjugués fluorescents dont les émissions sont assez différentes pour être sélectionnées à

volonté par l'emploi d'un filtre convenable.

Résultats:

a) sérologiques:

L'épuisement des euglobulines a été presque complet (le titre agglutinant passant de 1/256 à 1/8; mais le rendement (également évalué en facteur agglutinant) très faible, un important précipité, fluorescent, s'étant produit à la dialyse de l'urée.

b) immuno-électrophorétiques:

L'éluat a montré une bêta 2 M fluorescente, une alpha 2 fluorescente (pas vue au cours des manipulations antérieures, supériorité de la méthode en fluorescence et méconnue par nos I-S anti-culots de Heller-Svartz) et une trace de gamma non fluorescente.

B) Marquage des globulines gamma 606

Le marquage a été réalisé avant l'agrégation; de plus, on a vu que par dialyse contre un tampon pH 5,8 de faible force ionique on pouvait soustraire l'essentiel de la bêta 2 M, impureté qui précipite dans ces conditions avec une quantité de gamma importante, vraisemblablement en rapport avec le marquage lui-même.

L'éluat obtenu, dans ces conditions, a été de titre élevé; l'examen immuno-électrophorétique a montré que dans ce cas la gamma était fortement fluorescente, la bêta 2 M non fluorescente.

En conclusion, il semble acquis que la bêta 2 M vienne bien du sérum de P.C.E. et la gamma du réactif; il y aurait donc échange, à la différence de ce qui se passe avec le latex non sensibilisé.

Etude du facteur anti-globuline animale

On sait que, dans les réactions mettant en évidence le facteur antiglobulinique, la gamma globuline humaine peut être remplacée, après traitement convenable, par les globulines gamma de certaines espèces animales: porc et boeuf, en particulier.

Au marquage physique réalisé avec la lissamine-rhodamine, nous avons pensé substituer de la sorte un marquage immunologique plus élégant, en utilisant ces globulines gamma animales et grâce à l'emploi d'un I-S qui ne reconnaît ni la bêta 2 M, ni la gamma, chez ces deux espèces.

Les globulines porcines, davantage que les bovines, conviennent après agrégation par chauffage à 73°, à la préparation d'un éluat actif.

1°) Par consommation de l'I-S anti-S.H.N., on a mis en évidence la fixation sur la gamma animale, aussi bien avec le sérum témoin (négatif au 1/10 en latex) qu'avec le sérum de P.C.E (positif au 1/1.600 dans ce même latex) de gamma humaine alors que seul le sérum positif a montré la fixation de bêta 2 M.

Ces sérums sont d'ailleurs capables de précipiter en ring-test la gamma globuline de porc chauffée (à 63° seulement); il n'y a pas alors de dénaturation suffisante pour entraîner des agrégats visibles.

Dans l'éluat actif en Heller-Svartz qui a été obtenu par l'urée, de même que dans le précipité spontané qui est apparu à la dialyse de l'urée, on a identifié en I-E la gamma humaine, présente en grande quantité et la bêta 2 M.

En résumé, le mécanisme de la réaction serait indirect, selon le schéma:

(gamma animale + gamma humaine) + bêta 2 M-facteur

Note: Ceci peut être rapproché de la fixation de gamma, sur des globules rouges humains sensibilisés par un anti-sérum de lapin par une grande quantité de sérum normal.

I) Passage du facteur agglutinant dans les urines

Patte [12] ayant montré que la bêta 2 M ne semblait pas franchir la barrière rénale, à la différence d'autres globulines bêta et gamma, on a recherché, dans l'urine d'un sujet atteint de P.C.E., l'activité agglutinante, alors que le titre du sérum était de 1/1.024, les urines concentrées 75 fois ont été négatives à 1/1.

L'épuisement de 0,3 ml de sérum par 10 ml de ce concentré (soit 750 ml d'urine) a montré dans la zone qui nous intéresse l'épuisement en anti-gamma, anti-bêta 2 A, avec conservation de l'anti-bêta 2 B et l'anti-bêta 2 M.

II) Activité agglutinante des liquides d'ascite

La fréquence de la perturbation des tests de floculation hépatique dans la P.C.E. (qui a donné lieu à une théorie hépatique de la formation du facteur agglutinant) a fait examiner des liquides d'ascite (cirrhose éthylique), tant en Heller-Svartz, qu'en I-E.

Les euglobulines de liquide d'ascite ont permis d'obtenir un matériel agglutinant au 1/64 en H-S qui se révèle composé essentiellement de gamma, bêta 2 M (et C.R.P.).

Rapports du facteur avec la fibrinolyse

Le fibrinogène est très augmenté dans la P.C.E. (moins que dans le R.A.A., cependant), histologiquement, la lésion initiale est une dégénérescence fibrinoïde; enfin, dans l'arthrite juvénile, forme clinique particulière de P.C.E., il existerait une fraction (H.P.F.: heparin precipitable fraction) qui serait un polymère de fibrinogène).

Cette hypothèse a été examinée à l'aide d'un puissant immun-sérum anti-fibrinogène (qui nous a été donné par Mr Nussenzweig, que nous remercions) évidemment capable d'en montrer les produits de lyse.

L'étude en double diffusion de cet I-S a montré qu'il possédait de nombreux anticorps; l'I-E a montré: 4 anti-alpha 2 (dont l'alpha 2 lipo), l'anti-bêta 1 B, l'anti-bêta 2 M et l'anti-gamma, sans arc caractéristique entre sérum de P.C.E et S.H.N.

La recherche de produits de lyse dans le sérum de P.C.E. est évidemment impossible avec l'I-S non épuisé, car le fibrinogène même purifié contient encore les même antigènes (qui ont immunisé l'animal) et les réactions d'identité qui peuvent être mises en évidence sont sans signification. Après épuisement de l'I-S par du S.H.N. (séparé immédiatement après la coagulation), seul persiste l'anticorps anti-fibrinogène et, dans ces conditions, dans le sérum de P.C.E. on ne détecte aucun constituant en rapport avec le fibrinogène.

IMMUNO-ELECTROPHORESE MODIFIEE

Reste à expliquer la discordance entre le maximum de l'arc de bêta 2 M et la distribution du facteur agglutinant établie par découpage-élution de l'électrophorèse, soit de sérums de titre suffisamment élevé (égal ou supérieur à 1.256), soit d'euglobulines concentrées.

Il est à remarquer cependant que:

1°) L'emploi d'immun-sérums anti-bêta 2 M - facteur montre que l'arc de précipitation de la bêta 2 M recouvre et dépasse la zone où est retrouvée l'activité sérologique caractéristique; la discordance ne concerne que la répartition à l'intérieur de la zone bêta 2 M.

2°) Que l'élution à partir de la gélose est d'un mauvais rendement: on ne caractérise que le pic de concentration en facteur.

3°) Que dans le cas du facteur purifié on a obtenu une corrélation complète entre bêta 2 M et activité agglutinante. La littérature concernant la mobilité du facteur fait état d'une telle discordance, mobilité plus ralentie, donc davantage gamma-globulinique dans les euglobulines que dans le sérum total; nous n'avons pas retrouvé une telle modification dans les euglobulines, le titre plus élevé permettant une caractérisation plus étalée, mais le maximum n'est pas sensiblement déplacé du côté des globulines gamma. (Ziff a proposé l'explication d'un "entraînement" par des constituants du sérum).

Les faits suivants ont fait envisager une précipitation du facteur, au moins partielle, dans les conditions de l'immuno-électrophorèse standard:

a) faible migration hors de la cuve,

b) présence d'un "résidu de cuve", dont la coloration confirme la nature protéique, d'autant plus importante que le titre de Heller-Svartz est plus élevé.

c) Images de précipitation spontanées, sans lipoprotéines, visibles avec de nombreux sérums, dont le titre agglutinant est égal ou supérieur à 1/256; cette image de précipitation se produit immédiatement au voisinage de la cuve, côté gamma, sous la forme d'un trait d'abord net (après 30 minutes), puis d'une traînée plus ou moins allongée selon l'importance du champ électrique utilisé; la gamma et la bêta 2 M surtout, montrent un "renflement" de leur arc de précipitation en face de cette zone, tandis que l'activité agglutinante établie par découpage et élution dans un tampon 0, 2 M est maximum.

Paradoxalement, on a été conduit à porter le diagnostic de P.C.E. avec titre agglutinant élevé devant ce seul aspect avec un pourcentage idéal de réussite.

De telles images se rencontrent, mais alors circonscrivant la cuve, lorsque le sérum ou ses globulines sont examinés en double diffusion dans la gélose type immuno-électrophorèse.

d) Transformation de la "mobilité apparente bêta 1" en "mobilité" alpha 2 si la totalité de l'électrophorèse est déplacée par rapport à la cuve de départ, par le jeu de l'électro-endosmose.

Deux hypothèses ont été envisagées pour expliquer ces résultats:

A) Hypothèse physique: déplacement de la courbe de précipitation des euglobulines provoqué par:

1°) Le véronal; par sa structure, on connaît des macroglobulines à propriétés cryoagglutinantes qui sont spécifiquement (?) précipitées par le tampon véronal puisqu'elles ne précipitent pas dans les mêmes conditions de température, pH et force ionique dans un autre tampon.

2°) La gélose, par ses groupements acides (à la manière des mucopolysaccharides dans le cas des bêta lipoprotéines avec lesquelles les facteurs de la P.C.E. entretiendraient des liens).

On a étudié:

I) La solubilité du facteur en fonction du pH, à la tempé-

rature du laboratoire, à faible force ionique, par précipitation différentielle, dans le tampon véronal 0,025 M de l'I-E, ce qui a individualisé deux types extrêmes de sérum

a) le premier de titre élevé, précipite notablement à pH 8,2 et l'activité agglutinante des précipités à pH décroissant diminue rapidement. Ce sont ces sérums qui agglutinent le latex non sensibilisé et donnent en gélose une image de précipitation spontanée qui fait le diagnostic.

b) Le second, de titre faible, précipite peu à pH 8,2 et l'activité agglutinante augmente dans les précipités à pH décroissant, jusqu'à 5,8.

Notes: 1°) Ces différences suffisent à expliquer que l'on puisse trouver le facteur agglutinant, soit dans le surnageant et le précipité, soit dans le précipité seul avec les techniques grossières de dilution dans l'eau distillée, l'HCl dilué, etc... qui de plus, laissant les protéines à l'état insoluble, par défaut de sel pendant 2 à 4 jours provoquent des dénaturations irréversibles suffisantes à expliquer l'apparition d'"inhibiteurs".

A la dénomination d'euglobulines devrait être substituée celle de "protéines passant dans le "précipité" qui se forme dans des conditions de force ionique (mesurée par conductivité), de pH et de température, déterminées, dans un tampon défini et en présence, ou non, d'autres constituants sériques, également définis.

2°) Cette précipitation dans le tampon de l'I-E rappelle directement celle des macroglobulines pathologiques dont l'image en double arc (fréquente avec les macroglobulinémies européennes) est bien connue.

3°) Dans le tampon de l'I-E, et à la température du laboratoire, une partie du facteur agglutinant échappe à la précipitation et rend compte de la possibilité de la caractérisation du facteur dans la zone bêta 2 M dans sa totalité lors de l'éluion du facteur, puisqu'une importante partie, la moins soluble, précipite spontanément. Titre du sérum:

1/512, titre du surnageant à pH 5,8: 1/16.

II) L'action de la gélose sur:

1°) La solubilité du facteur: elle paraît négligeable, au moins dans le cas où le facteur est maintenu en présence des autres constituants sériques.

2°) L'activité du facteur: nulle dans le système globules rouges humains sensibilisés par un immun-sérum de lapin (il y a par contre une certaine inhibition si le facteur est évalué dans le système globules rouges Rh+ sensibilisés par un anti-Rh): si le sérum est dilué dans un volume égal de gélose à 2%, maintenue en surfusion à 45°, le titre obtenu reste identique, à la dilution au 1/2 près, après élu-tion de la gélose.

III) L'interaction du facteur avec les mucopolysaccharides acides type héparine.

Nous avons établi: l'absence de lipides: 1°) dans le trait de précipitation spontané apparaissant au cours de l'électrophorèse (avec le noir Soudan).

2°) dans les éluats obtenus, ayant l'activité agglutinante ou antiglobulinique (idem).

Nous avons examiné en latex et en Heller-Svartz la bêta-lipoprotéine obtenue par le sulfate de dextrane, en présence de calcium d'un sérum de P.C.E. Le produit obtenu, concentré 8 fois, a un titre de 1/32 (soit 1/4 en réalité): le surnageant conserve un titre sensiblement identique: 1/256 à celui du sérum de départ. Examiné en I-E, il montre l'alpha 2 lipo classique et trois impuretés minimales: 1 alpha 2 et deux bêta 1.

Nous avons étudié l'action de l'héparine à doses croissantes, entre 0,05 et 1mg/ml; évaluée en Heller-Svartz, elle est nulle.

Nous avons tenté de reproduire la réaction décrite sous le nom d'"héparine latex fixation test", sans succès probant.

IV) L'interaction du facteur avec le merthiolate.

A la concentration employée pour prévenir les contamina-

tions (1/10.000) il est sans action sur le titre du facteur agglutinant et sur la mobilité évaluée par découpage de l'électrophorèse.

V) La fraction euglobulinique qui précipite à pH 8,2 et faible force ionique et a une forte activité agglutinante; elle comprend gamma, bêta 2 M et plusieurs alpha 2, dont une alpha 2 principale, identique à celle mise en évidence dans l'éluat des systèmes sensibilisés ayant fixé le facteur.

VI) L'action de la séparation électrophorétique elle-même: toutes les fractions précipitées dans le tampon véronal de l'I-E en abaissant le pH à 7,5, 7, 6,5 et qui sont parfaitement resolubilisées dans ce même tampon à pH 8,2 donnent un précipité visible en I-E.

Note: A l'état physiologique, la quantité totale des euglobulines du sérum est de l'ordre de 2mg/ml; celle des "gamma euglobulines" (euglobulines qui précipitent à pH 7,5 de l'ordre de 0,5mg/ml et celle de l'euglobuline 1,1 (qui précipite même à pH 8 de 0,2mg/ml. Mais la quantité de gamma euglobulines peut atteindre 5, 10 et jusqu'à 15mg/ml, chez des Africains.

Ces constatations ont fait pratiquer des I-E dans des conditions tendant:

1°) d'une part à permettre la mobilité d'un complexe volumineux: champ de 12 volts/cm, pendant 60 minutes, à faible force ionique. On a obtenu une image de précipitation effilochée, étirée, se superposant étroitement à la localisation du facteur, mais restant sensiblement plus rapide dans son maximum que la bêta 2 M, lors de l'emploi du tampon véronal.

2°) D'autre part, à éviter la précipitation par défaut de sel.

a) Dans un tampon borate à pH 8,9, il n'y a pas eu d'image de précipitation visible (champ de 12 volts/cm), la mobilité du facteur hors de la cuve est devenue significa-

tive, mais le maximum d'activité est resté distinct du maximum de la bêta 2 M.

b) Dans le tampon véronal classique, mais préparé en eau physiologique (0,15 M) et sous un champ faible, de l'ordre de 2 volts/cm. Dans ces conditions, la mobilité du facteur n'est pas davantage entièrement superposable à celle de la bêta 2 M.

Hypothèse Immunologique

Le facteur sous forme de 22 S serait un complexe soluble: complexe immunologique en excès d'antigène la globuline gamma.

On sait que les complexes immunologiques, enzymatiques ou "physico-chimiques" (ex.: haptoglobine/hémoglobine) ont une mobilité modifiée qui a priori doit tendre vers celle du constituant principal et doit dépendre de la charge nette (vraisemblablement abaissée) de la forme, de la taille et, enfin, dans le cas qui nous occupe, de la dynamique propre de ce complexe: les sérums de P.C.E., dilués, précipitent volontiers spontanément, à la conservation. Lors de la préparation de facteur purifié on élimine la totalité ou la quasi totalité de l'"antigène", s'il y a complexe, c'est en excès d'anticorps et on ne court plus le risque de voir le système arriver à l'équivalence lorsque la gamma de mobilité (négative) plus grande que celle de la bêta 2 M, et a fortiori du complexe, est soustraite par le champ électrique. On a donc étudié:

1°) La mobilité du facteur dans du sérum traité par l'urée 8 M, à volume égal; dialysé contre l'urée 4 M, puis contre un tampon (l'urée est capable de dissocier le 22 S en 19 S (sérologiquement actif) et en 7 S (sérologiquement inactif) sans que l'on ait pu prouver si cette dissociation est réversible).

L'action de l'urée n'a modifié, ni le titre agglutinant, ni le schéma immuno-électrophorétique, ni la mobilité du facteur évaluée par découpage-élution.

2°) L'action de la cystéine sur les propriétés immunologiques des sérums de P.C.E. positifs en Heller-Svartz.

Selon certains auteurs, dans le 22 S (complexe 19 S + 7 S), le 19 S serait un polymère de 7 S normal, et son immunologie particulière serait supportée par les liaisons S-S de polymérisation, la différence dans la teneur en carbohydrates (environ 10 %) avec la 7 S (environ 2 %) proviendrait de la participation d'une alpha 2 globuline.

Il semble plus vraisemblable que le "motif monomère" sans préjuger de communautés possibles, de la 19 S (bêta 2 M) soit différent de celui de la 7 S, et que la teneur élevée en carbohydrates soit à rapporter à la présence d'alpha 2 M. Un sérum de P.C.E., de titre 1/1.000, a été traité par la cystéine 0,1 M.

Après dialyse de la cystéine, le titre est tombé à 1/4. Examiné en I-E, la bêta 2 M n'est plus visible (du moins à sa place habituelle).

L'I-S anti-S.H.N. épuisé par deux volumes de sérum traité par la cystéine et reconcentré conserve deux anticorps à l'égard d'un sérum de P.C.E., un anti alpha 2 et un anti bêta 2 (le témoin épuisé par deux volumes de sérum non traité par la cystéine est quant à lui totalement épuisé).

En dépit de l'intérêt de ce résultat, nous n'avons pu définir ces deux protéines en raison d'une inexplicable difficulté à négativer l'activité agglutinante avec la cystéine.

3°) La mobilité d'un immun complexe, anti-gamma en excès de gamma, où l'anti-gamma avait été marqué à la lissamine-rhodamine a montré qu'il pouvait se produire un trait de précipitation spontanée au sortit de la cuve côté gamma, alors que ce même I-S rendu fluorescent et déposé dans la cuve antigène ne montre pas cette zone de précipité; d'ailleurs il a été constant que nos immun-sérums "spécifiques", épuisés par un grand excès de sérum normal (et contenant de ce fait, des protéines humaines normales libres que révèle ce même I-S non épuisé, en double diffusion, ainsi que des complexes solubles en excès d'antigène) exhibent une auréole

de précipitations spontanées qui peuvent être multiples en gélose I-E.

Note: Dans le cas du sérum de cheval hyperimmunisé, il existe une distribution hétérogène des anticorps qui sont à la fois de mobilité gamma et bêta 2 ou pour certains seulement bêta 2, résultat de l'hyperimmunisation. Cet aspect, attribué au marquage, a été confirmé à l'Institut Pasteur de Garches.

RECHERCHE D'UNE MARQUE IMMUNOLOGIQUE PROPRE

A LA P.C.E.

Introduction

Svartz et Schlossmann, ayant purifié le facteur agglutinant, ont conclu qu'il était antigénique et que les immun-sérums correspondants étaient capables de produire son inhibition. [14]

Brown et Ziff, par injection de cryoglobulines de P.C.E. auraient obtenu deux anticorps caractéristiques. [1]

Mais ces résultats n'ont pas été confirmés par les auteurs eux-mêmes car de nombreuses difficultés tenant à la nature du facteur agglutinant rendent hasardeuses les conclusions tirées des images ou des inhibitions, même les plus significatives en apparence.

Méthode d'étude

Etant en possession de la méthode immuno-électrophorétique qui permet de lever parfaitement toutes ces hypothèses, nous avons réalisé une série d'immunisations (une trentaine au total) pour:

1°) vérifier si le couple gamma-bêta 2 macro, mis en évidence, correspondait bien au facteur étudié;

2°) établir si une marque immunologique particulière pouvait lui être attribuée, en faisant:

a) soit une macroglobuline normale seulement augmentée par rapport au sérum normal, mais cependant distincte des autres macroglobulines. Dans ce but, les divers immun-sérums spécifiques obtenus ont été épuisés avec 1,5 volume de S.H.N., négatif en Heller-Svartz au-delà de 1/5, mais cependant TRAITE PAR UN CULOT DE G.R.S. (i.e. privé de:

- la faible activité agglutinante qu'il possède,
- d'une partie au moins d'une alpha 2 globuline.

b) Soit une véritable macroglobuline propre à l'affection rhumatismale.

Dans ce cas, les I-S spécifiques ont été épuisés par du S.H.N. non TRAITE G.R.S.

Dans les deux cas, un mélange provenant d'un nombre élevé

de donneurs normaux a été utilisé (supérieur à 20) ceci pour éliminer l'intervention de groupes sériques et en particulier de groupes d'haptoglobine dont la traduction immunologique est établie.

Les I-S épuisés ont ensuite été reconcentrées sous forme de globulines (précipitées par le sulfate d' NH_4 à 40 %) au 1/4 de leur volume initial, environ.

Les I-S, épuisés et reconcentrés, ont été examinés en Ouchterlony et en I-E vis-à-vis de S.H.N., S.H.N. mais C.R.P. positif, S.H.N. traité G.R.S., S.P.C.E. de titre agglutinant élevé, S. de P.C.E. traité G.R.S. (i;e; privé de facteur + protéines X).

Note

Les immun-sérums anti-S.H.N., 491 et 1299, ainsi épuisés par 1,5 volume de S.H.N. traité G.R.S. ne conservent aucun anti corps à l'égard de ce même S.H.N. non traité: la fixation de l'alpha 2 qu'ils reconnaissent dans l'éluat de G.R.S + sérum de P.C.E. ou S.H.N. n'est donc pas totale dans le rapport G.R.S./sérum capable d'entraîner la disparition totale de l'activité agglutinante d'un sérum de titre élevé (1/1.000): 10ml de culot de G.R.S. pour 1ml de sérum.

Immun-sérums anti-sérum de P.C.E.

A) Préparés chez le lapin

a) Deux lapins ont été immunisés avec le sérum provenant d'un seul malade (titre du sérum en Heller-Svartz supérieur à 1/1.000).

Les I-S obtenus montrent après concentration de 4 fois environ, respectivement 12 et 20 arcs communs au sérum normal et au sérum de P.C.E.

En particulier, la bêta 2 M, et l'alpha 2 M; mais pas la C.R.P.

Après épuisement, le sérum n° 1 conserve une ligne de précipitation large, d'apparition tardive, proche de la cuve antigène, avec le sérum de P.C.E. de titre élevé seulement, quand examiné par la méthode d'Ouchterlony.

Mais cette image de précipitation n'a pu être obtenue en I-E dans la zone où a été localisée l'activité agglutinante (sensiblement bêta 1).

b) Deux lapins ont été émunisés avec un mélange de sérums de P.C.E., riches en facteur activateur.

Examinés en I-E sans concentration préalable, ces I-S montrent 12 et 14 arcs de précipitation spécifique, y compris la bêta 2 M.

Après épuisement, seul l'I-S n° 846 montre une ligne de précipitation avec le sérum de P.C.E.

Mais l'I-E ne permet pas de localiser cette image dans la zone du facteur.

B) Préparés chez la poule

a) Deux poules sont mortes de choc anaphylactique à la troisième injection intraveineuse, malgré la protection fournie par 2ml. de phénergan.

Leur sérum examiné en I-E décèle une douzaine de protéines, sans concentration préalable.

Après épuisement par le S.H.N. traité G.R.S., le mélange de ces deux I-S conserve

1°) un anticorps vis-à-vis du sérum de P.C.E. et du S.H.N. C.R.P. +, en Ouchterlony, mais il ne s'agit pas de la C.R.P., car l'I-E montre que la protéine ainsi mise en évidence possède une mobilité alpha 2 et non bêta 1-bêta 2, comme c'est le cas pour la C.R.P.

2°) Une ligne de précipitation floue, large, tardive caractéristique du sérum de P.C.E. possédant une activité agglutinante.

Mais une fois encore, l'I-E n'a pas permis de reproduire cette image.

b) Trois poules ont pu être menées au terme de leur (courte) immunisation. Leur sérum examiné en I-E possède une quinzaine d'anticorps au moins: gamma, bêta 2 A, bêta 2 M, 4 bêta 1 etc....

Après épuisement, le mélange de ces I-S conserve une ligne

de précipitation avec le sérum de P.C.E. seulement, en Ouchterlony.

Image que l'on a pas retrouvée en I-E.

Note: L'intérêt de l'immunisation de poules est triple.

1°) Des anticorps précipitant en gélose, peuvent être obtenus en moins d'une semaine, et ceci sans emploi d'aucun adjuvant (sous réserve d'utiliser la voie intraveineuse et des doses convenables d'antigène).

2°) Le producteur d'anticorps n'appartenant plus à la famille des mammifères est capable de s'immuniser vis-à-vis de motifs antigéniques différents apportant ainsi un "point de vue" original.

3°) Les anticorps de poule précipitent mieux dans une gélose contenant 10 à 12 % de NaCl. Il est alors possible de préciser le sens d'une image de précipitation: les anticorps de lapin et de cheval ne donnant pas d'image visible dans ces conditions; dans le cas du facteur de la P.C.E. dont on connaît les propriétés anticorps, il semble possible d'éliminer la formation d'une image de précipitation due au facteur lui-même, réagissant avec:

- a) les globulines humaines ou animales,
- b) les complexes solubles présents dans l'I-S épuisé.

Immun-sérums anti-euglobulines de P.C.E.

A) Dans le but de limiter le nombre d'antigènes injectés et, partant, d'augmenter les chances d'immunisation "spécifique", cinq poules ont reçu 5 injections intraveineuses d'euglobulines purifiées (par 3 précipitations successives à pH 5,8 et faible force ionique) et contenant toute l'activité agglutinante du sérum de P.C.E. employé.

1°) Ce matériel comparé en double diffusion à un éluat de facteur agglutinant ne montre que deux constituants supplémentaires:

- dans l'éluat gamma, bêta 2 M et une alpha 2
- dans les euglobulines deux bêta supplémentaires:

la bêta 1 A et la C.R.P.

2°) L'examen I-E des I-S obtenus révèle la présence de 13 anticorps au total, y compris des anticorps anti-albumine (chez 2 poules) et un anti-C.R.P. (chez une poule seulement)

Ces résultats illustrent:

a) le décalage de sensibilité entre caractérisation in vitro (même au moyen de la méthode immuno-électrophorétique et en utilisant la technique des épuisements par un excès du produit inconnu) et immunisation,

b) l'hétérogénéité des réponses entre animaux d'un même lot, recevant un même mélange d'antigènes.

3°) Après épuisement, le mélange concentré de ces I-S montre un arc flou avec le sérum de P.C.E. seul, en Ouchterlony.

L'I-E a montré une ligne "qualitativement" analogue de mobilité sensiblement gamma.

B) Cinq poules ont été injectées avec des culots de Heller-Svartz lavés 6 fois après avoir fixé le facteur agglutinant (5 injections).

Ces I-S ont été rangés à la rubrique anti-euglobulines car nous avons été contraints d'utiliser des euglobulines de P.C.E. pour l'injection de rappel en raison de la mortalité

produite par l'injection I-V de globules rouges sensibilisés.

Ces I-S reconnaissent les gamma, la bêta 2 A, la bêta 2 M, la bêta 1 A, l'alpha 2 M; deux poules sont anti-bêta 1/4 et anti-albumine. Le Soudan révèle l'anti-alpha 2 lipo. Après épuisement par le S.H.N. (1 volume), deux poules conservent un anticorps vis-à-vis d'une alpha 2, présente dans le sérum normal (l'épuisement n'avait donc pas été correct); la bêta 2 M, encore une fois, ne montre aucune marque immunologique particulière.

Immun-sérums anti-facteur anti-globulinique

A) Par injection de facteur fixé sur latex sensibilisé.

Cinq poules ont reçu 5 injections intraveineuses de facteur fixé sur latex sensibilisé et lavé 4 fois dans un grand volume de tampon (i.e. jusqu'à ce que le liquide de lavage ne montre plus de protéines).

Les I-S obtenus possèdent, examinés en I-E, jusqu'à 10 arcs de précipitation essentiellement: gamma, bêta 2 A et bêta 2 M, alpha 2 macro, ect...

La multiplicité des protéines qui s'adsorbent non spécifiquement sur le latex autant que l'absence de pureté des lots de globuline gamma utilisés pour ces immunisations ne permettent de tirer de conclusion des résultats de cette immunisation quant à la nature du facteur lui-même.

Ces I-S méritent seulement d'être épuisés par le S.H.N.

Après épuisement, ils ne conservent aucun anticorps vis-à-vis du sérum de P.C.E.

B) Par injection de latex non sensibilisé, ayant fixé le facteur antiglobulinique, quatre poules ont été immunisées. Leur sérum a montré au total 7 protéines (après mélange et concentration): 3 alpha 2, dont l'alpha 2 M, 2 bêta 1, une bêta 2 et la gamma.

Après épuisement, l'un de ces sérums conserve, avec le sérum de P.C.E., une ligne de précipitation en Ouchterlony;

en I-E, une image de mobilité gamma.

Note : Dans les deux cas, A et B, on a remarqué un deuxième arc de gamma, en arrière de l'arc principal, avec certains I-S.

Immun-sérums anti-facteur agglutinant

Deux lapins ont reçu 10 injections, avec adjuvant de Freund, de facteur agglutinant fixé sur des globules rouges sensibilisés et lavés trois fois en eau physiologique. Chaque injection correspondant à la totalité du facteur contenu dans un ml de sérum de P.C.E. de titre agglutinant 1/1.000.

Examinés en I-E, ils reconnaissent:

Le premier: la gamma, la bêta 2 M, l'alpha 2 lipo et une alpha 2 euglobuline.

Le second: la bêta 2 M et une seule alpha 2 (non lipo).

Note: L'alpha 2 euglobuline qu'ils mettent en évidence correspond au moins pour le premier (nous n'avions pas utilisé le second à cet effet) à l'alpha 2 retrouvée dans l'éluat de G.R.S. possédant une activité agglutinante.

Quatre lapins sont morts après une injection de G.R.S. + facteur: choc anaphylactique ou action agressive du complexe lui-même.

A) Nature de l'alpha 2 non lipo vue par les I-S anti-culots de Heller-Svartz.

Ces I-S précipitent en double diffusion l'alpha 2 macro préparée par Schultze et cette alpha 2 examinée à la concentration de 400 gamma/ml paraît homogène.

Mais en I-E, examinée avec divers immun-sérums anti-S.H.N. (491, 1299, Estelle) ou anti-P.C.E., elle montre:

a) à l'examen direct, à la concentration de 4mg/ml: 2 alpha 2 (alpha 2 M et une autre alpha 2 non lipo, plus courte, diffusant encore moins, qui peut être envisagée comme également macro selon Hartman; nous avons retrouvé cette alpha 2 dans une préparation dite pure de properdine concentrée, une bêta 2 et de la gamma.

b) Par épuisement de 0,5 ml de 1299 par 8mg de cette alpha 2 purifiée, on voit qu'elle renferme au moins 2 alpha 2, de la bêta 2 A, de la bêta 2 M et de la gamma.

Nos I-S anti-culots de Heller-Svartz

1°) reconnaissent l'alpha 2 constituant principal par définition alpha 2 macro;

2°) donnent une réaction d'identité avec l'arc d'alpha 2 macro mis en évidence par l'I-S 1299, aussi bien avec un sérum normal qu'avec cette préparation purifiée. On est donc autorisé à conclure que se fixent sur le système sensibilisé: gamma, bêta 2 M, alpha 2 lipo et alpha 2 macro.

B) Rôle dans l'agglutination des G.R.S.

1°) A la concentration de 1mg/ml (et moins) l'alpha 2 M de Schultze est incapable

a) d'agglutiner les G.R.S.

b) de renforcer ou d'inhiber l'agglutination des G.R.S. par un sérum de P.C.E. d'une manière significative: la différence dans le sens d'une inhibition étant de un tube (agglutiné à 1 croix dans le témoin).

2°) Les alpha 2 d'un sérum de P.C.E. ne modifient pas la puissance du facteur agglutinant de la P.C.E. (séparé par électrophorèse). Pour cela, dans une grille à double entrée, on a étudié les effets de la recombinaison des éluats des tranches découpées dans la gélose de l'électrophorèse de 1ml de sérum de P.C.E. de titre élevé; une nouvelle fois, on a constaté que l'activité était maximum dans la cuve (dont l'éluat est actif au 1/16) et s'étendait légèrement plus côté négatif que côté positif, i.e. une mobilité typiquement bêta 1.

Si l'on considère que l'on fait migrer 1,2 ml de sérum de P.C.E. de titre agglutinant 1/512, ceci dans un volume total de gélose évalué par pesée à 30ml environ et que les éluats ont fourni 25ml de liquide (on a pris la précaution de ramener la gélose à une concentration saline voisine de 0,15 M avant la congélation-décongélation, permettant

la destruction de la structure du gel) on devrait attendre de la réunion de ces éluats une dilution du sérum au 1/25 environ, soit une activité agglutinante au 1/16.

Or, l'activité agglutinante des éluats de gélose réunis est nulle.

On a dosé photométriquement la quantité de protéines totales, présente dans cet éluat et on a évalué immunochimiquement sa composition par épuisement d'un I-S anti-S.H.N.

Ceci ne semble pas fournir d'explication à la disparition de l'activité agglutinante.

Résultats des épuisements

1°) Après épuisement par un volume de S.H.N., il ne reste aucune ligne de précipitation vis-à-vis du sérum de P.C.E. en I-E, mais une ligne de précipitation vis-à-vis de ce même sérum de P.C.E. traité par les G.R.S. et constituant le témoin négatif.

Ceci a été interprété comme un anticorps anti-hémoglobine: en effet, l'image de précipitation montre un double arc, le premier flou et de mobilité alpha 2 lente correspondant à l'hémoglobine fixé sur l'haptoglobine, le second à l'hémoglobine libre en excès, de mobilité bêta 2 rapide.

2°) Après épuisement par 1 volume,5 de S.H.N. traité G.R.S., ces deux I-S conservent, en Ouchterlony, une ligne de précipitation avec le sérum de P.C.E. agglutinant, rien avec le sérum traité G.R.S., mais également une ligne de précipitation vis-à-vis du S.H.N. non traité G.R.S. (et rien évidemment avec le sérum normal traité G.R.S. ayant servi à l'épuisement). Il y a identité entre S.H.N. et S. P.C.E. L'I-E a montré qu'il s'agissait d'une alpha 2 globuline.

Nous n'avons pas su interpréter ce résultat.

En effet:

a) Il ne peut s'agir de l'alpha 2 lipo; un seul de nos deux immun-sérums est anti-alpha 2 lipo, cette image de précipitation ne prend pas le soudan, nos immun-sérums épuisés renferment un excès d'alpha 2 lipo.

b) Il ne peut a priori s'agir de l'alpha 2 M, puisque notre S.H.N. traité G.R.S. contient de l'alpha 2 M détectable par le 1299, en quantité sensiblement égale à celle du témoin non traité G.R.S.

L'I-S épuisé et reconcentré contient de l'alpha 2 M en excès (vue par 1299). Ceci a été mis en évidence en double diffusion comme en I-E, dans un montage permettant une réaction d'identité avec l'alpha 2 M de Schultze.

Deux hypothèses ont été envisagées:

1°) L'alpha 2 macro possède une fraction euglobulinique en très faible quantité dans le sérum normal, immunologiquement différente de l'alpha 2 macro totale; en effet, le 1299 épuisé bêta 2 M gamma montre dans les euglobulines une protéine en très faible quantité n'ayant qu'une réaction de communauté partielle avec l'alpha 2 M de Schultze. Cette fraction alpha 2 M serait seule capable de se fixer sur les G.R.S. et l'anticorps correspondant ne serait pas épuisé par le S.H.N. traité G.R.S.

Un argument en faveur de cette hypothèse est apporté par le fait que l'épuisement par le S.H.N. non traité G.R.S. ne laisse persister aucune ligne de précipitation.

D'autre part, nos I-S épuisés ne précipitent plus l'alpha 2 M autrement qu'en ring-test; cette préparation ne contiendrait donc qu'une fraction très minime de cet antigène.

2°) Il s'agit d'une image de précipitation non immunologique, faisant intervenir le couple haptoglobine-hémoglobine. Malgré l'utilisation des globulines 40 % sulfate d' NH_4 , nos I-S reconcentrés sont contaminés par de l'hémoglobine et l'haptoglobine est fortement augmentée dans les sérums de P.C.E.

Note: L'hémoglobine provient du S.H.N. traité G.R.S. qui est toujours un peu hémolysé.

On a envisagé l'équation:

Hb en excès de l'I-S épuisé / haptoglobine disponible
augmentée P.C.E.

(l'explication de l'absence de trait de précipitation avec

le sérum P.C.E. ou le S.H.N. traités G.R.S. résidant dans la saturation de l'haptoglobine)

Hb en excès de l'I-S épuisé / Hb en excès des sérums traités G.R.S.

1°) en faveur de cette hypothèse: l'aspect chargé d'Hb après lavage de la ligne de précipitation ainsi que le doublement de cette ligne avec certains sérums.

2°) contre:

a) la production d'une précipitation en milieu liquide,

b) la rapidité de sa formation en gel,

c) la présence d'un maximum net,

d) on n'a pu reproduire une telle image avec comme I-S un mélange de sérums de lapin neuf et de sérum humain normal hémolysés, concentrés sous forme de globulines. Aussi l'hypothèse formulée en I est-elle la plus vraisemblable.

Origine des anti-gamma et anti-bêta 2 M.

Il nous a été fort justement objecté que la gamma et la bêta 2 M ayant immunisé nos animaux pouvaient provenir des globules rouges humains eux-mêmes et nous avons pu vérifier que cette objection était pleinement justifiée pour les globulines gamma.

1°) Une dizaine d'I-S de lapins anti-G.R. humains lavés trois fois en eau physiologique après concentration se sont révélés anti-gamma.

2°) On a épuisé un I-S anti-S.H.N. par un culot globulaire lavé trois fois en eau physiologique et on a pu calculer qu'il restait entre 20 et 40 microgrammes de globulines gamma par ml de culot globulaire à la surface des globules rouges.

3°) Plus gênante était la publication de Svheidegger concernant la libération de quantités importantes de gamma et de bêta 2 M à partir de G.R. lavés dans une solution isotonique de saccharose sous l'action de la phénylbutazone.

Nous avons vérifié que le lavage en saccharose ne pouvait être comparé en aucune façon au lavage en eau physiologique seuls, les lavages en saccharose laissant à la surface des globules rouges gamma, bêta 2 M et bêta 2 A. On a épuisé l'I-S anti-S.H.N. par les protéines concentrées contenues dans les 10ème liquides de lavages, en eau physiologique, de 4 fois 125ml de culot globulaire, soit en eau physiologique, soit en saccharose.

Conclusion:

Il n'a pas été possible, par la méthode d'immuno-électrophorèse, d'attribuer une marque immunologique particulière au facteur caractéristique de la P.C.E., envisagé comme une bêta 2 M. Et, cependant, l'examen de certains immun-sérums "spécifiques" épuisés par le S.H.N., en Ouchterlony, avait montré la persistance d'image de précipitation avec le sérum de P.C.E. seulement. Kunkel (10) a conclu, à partir de l'immunisation de trois lapins avec des globulines gamma de P.C.E., à l'absence d'antigénicité particulière de la 19S-facteur.

De même, nous avons pu ~~inhiber~~ inhiber des réactions au latex avec notre I-S anti-bêta 2 M en utilisant, pour sensibiliser le latex, une gamma suffisamment pure pour que notre immun sérum ne soit pas lui-même capable d'agglutiner les particules de latex sensibilisées; mais la gamma de lapin non immunisée est également capable d'inhiber, sans que la différence entre les pouvoirs inhibants, globulines immunes/globulines normales (il n'est en effet pas possible d'utiliser le sérum total qui a un effet inhibiteur non spécifique) puisse emporter la conviction, d'autant que les animaux immunisés présentent une hyper-globulinémie considérable.

ETUDE DU DETERMINANT ANTIGENIQUE COMMUN AUX DEUX
TYPES DE REACTIONS EMPLOYEES, DEFINISSANT LES FAC-
TEURS AGGLUTINANTS ET ANTIGLOBULINIQUES

I) Facteur agglutinant

A) Nature des protéines responsables de la sensibilisation des hématies humaines O⁻, par l'immun-sérum de lapin homologue.

1°) Par découpage de l'électrophorèse du sérum de lapin sensibilisant on a établi que l'agent sensibilisant avait une mobilité typiquement gamma.

2°) Par élution à partir de globules rouges humains formolés sensibilisés par l'I-S de lapin anti-homme, on a obtenu une solution I-E pure de globulines gamma anticorps (rendement: 80 % environ).

Remarques:

a) Cet immun-sérum avait été décomplémenté (chauffage à 56°, 45 minutes), de plus on a employé des globules rouges formolés, ce qui peut expliquer que l'on ait pas vu de complément dans l'éluat.

b) Il ne s'agit donc pas d'un anticorps de mobilité bêta 2, comme il est classique au cours de l'hyperimmunisation (hyperimmunisation nécessaire à la mise en évidence du facteur agglutinant).

c) Cette étude a été conduite à l'aide d'un I-S de bouc anti-sérum de lapin qui montre 20 arcs de précipitation au moins, dont un arc supplémentaire de mobilité gamma auquel il est tentant d'identifier l'anticorps sensibilisant.

B) Rôle des anticorps anti-protéine humaine du sérum sensibilisant. On sait que le facteur interfère avec les systèmes protéine-anti-protéine; or, de telles liaisons sont probables dans les G.R.S. puisque d'une part les I-S sensibilisants employés sont anti-gamma, et que, d'autre part, les hématies sont rarement lavées plus de 3 fois et qu'elles sont alors revêtues d'une quantité notable de gamma. Mais cet immun-sérum de lapin épuisé par une quantité suffisante de S.H.N. et employé pour sensibiliser des globules rouges lavés 10 fois en eau physiologique permet d'obtenir des

titres égaux aux témoins effectués selon la technique de routine (avec 5 sérums de P.C.E. de titres étagés).

C) Comparaison entre un anticorps naturel d'origine humaine qui ne convient jamaïs à la mise en évidence du facteur agglutinant et un anticorps immun également d'origine humaine (qui peut, mais non avec tous les sérums, convenir).

Après fixation sur des globules rouges humains:

1°) O+ d'un anti Rh

2°) B d'un anti B

et après lavages, le culot globulaire a servi à épuiser l'I-S (282) anti-S.H.N., ceci a montré que: l'anticorps immun était une gamma et que l'anticorps naturel était une bêta 2 M.

II) Facteur antiglobulinique

1°) Etude de la mobilité électrophorétique en gélose du "déterminant" nécessaire à la sensibilisation du latex. 50mg de globulines gamma humaines (fraction II) ont été séparées par électrophorèse en gélose.

Les protéines éluées des tranches de gélose, chauffées à 63° ont été utilisées pour sensibiliser des particules de latex, dont l'agglutination a été produite par un sérum de P.C.E. n'agglutinant pas le latex non sensibilisé.

Le "déterminant" montre une mobilité gamma typique.

2°) Etude des propriétés immunologiques de la globuline gamma humaine, chauffée à 73°, qui a été employée pour l'élution du facteur antiglobulinique.

Cinq poules ont reçu 4 injections intraveineuses de gamma globuline agrégée (F II).

Les I-S obtenus, réunis, concentrés contiennent 6 anticorps précipitants qui, examinés en I-E, ont montré être les anti-albumines, deux alpha 2, une bêta 1, la bêta 2 A et la gamma. L'anticorps le plus important étant évidemment l'anti-gamma. Ceci illustre l'hétérogénéité des fractions II.

Ces immun-sérums ont été titrés: 1°) à l'égard de globules

rouges sensibilisés par un anti-Rh incomplet, titre compris entre 2.500 et 5.000.

2°) à l'égard de particules de latex sensibilisées par la même gamma globuline, chauffée seulement à 63°, titre compris entre 1/1.250 et 1/2.500.

On peut conclure que la gamma globuline chauffée à 73° conserve au moins une partie de son antigénicité normale, mais on est frappé par le relativement faible titre anti-latex.

3°) Vis-à-vis de globuline gamma agrégée à la concentration de 5mg/ml; dans ces conditions, on obtient une poussière d'agrégats qui ne centrifugent pas si non agglutinés. Titre jusqu'à 1/40 alors que les sérums de poule neuve sont négatifs même à 1/1.

4°) La globuline gamma non chauffée est incapable d'inhiber cette agglutination même à la concentration de 1mg/ml.

Etude en précipitation

Les cinq poules montrent une réaction d'identité complète entre gamma chauffée et non chauffée (alors qu'on espérait une réaction d'identité partielle seulement). Après épuisement par un volume de S.H.N. frais (pour éviter toute dénaturation de la gamma), ces I-S conservent un anticorps vis-à-vis de la gamma chauffée à 63°; rien vis-à-vis de la gamma à 73° et du S.H.N.

Interprétation:

Dans le cas de la gamma à 73°, le motif de chauffage est supporté par une protéine insoluble.

Recherche d'une communauté entre la gamma chauffée et l'anticorps de lapin sensibilisant.

I) Propriétés des immun-sérums anti-gamma 73°.

a) Propriétés sérologiques des I-S de poules anti-gamma 73°.

Ces I-S examinés en Heller-Svartz fournissent des titres compris entre 1/1.280 et 1/2.560, mais le titre d'hétéro-agglutinines atteint 1/320. Ce résultat est incontestable-

ment significatif: les poules anti-"gamma" humaine chauffée sont anti-"gamma" de lapin ce qui donne l'explication la plus simple.

Mais confirmation a été recherchée dans l'élimination de l'hétéroagglutinine. On a utilisé le système suivant: globules rouges de poules sensibilisées par un immun-sérum de lapin anti-boeuf (réaction croisée). Les titres ont été de 1/80 à 1/320 pour les poules immunisées vis-à-vis des globules rouges sensibilisés, toujours inférieurs à 1/10 vis-à-vis des globules rouges non sensibilisés.

Les témoins G.R. sensibilisés ont été:

(poules neuves: négatives au 1/10

) S.H.N. négatif au 1/10

(S. P.C.E. (titre Heller-Svartz) + 1/256 =
1/256

Il semble donc permis de conclure à une communauté entre gamma humaine chauffée et anticorps sensibilisant de lapin.

b) Etude en précipitation.

Le mélange des I-S de poule anti-gamma 73°, concentrés 5 fois sous forme de globulines, précipite les globulines gamma de l'I-S de lapin en immuno-électrophorèse.

Remarques:

Les immun-sérums montrant des communautés antigéniques entre gamma humaine et animale ont été décrits [9]; les communautés semblant porter par ordre d'éloignement d'espèce sur l'albumine, les alpha 1, alpha 2 et bêta, etc. Ce résultat heureux tient-il à l'emploi de poules pour l'immunisation ou au chauffage de la gamma ?

On a immunisé cinq poules avec de la gamma humaine chauffée à 63°; certains I-S se sont également révélés anti-gamma de lapin.

II) Propriétés de 5 immun-sérums de poules anti-gamma de lapin.

Cinq poules ont été immunisées avec des globules rouges de mouton sensibilisés par l'anticorps de lapin correspondant (l'immun-sérum a été décomplémenté par chauffage à

56°, la dernière injection effectuée avec de la globuline de lapin purifiée, les culots ont été lavés 4 fois.

Ces immun-sérums de poules (anti-G.R. de mouton + anticorps de lapin):

A) Agglutinent:

1°) Les globules rouges humains sensibilisés par un immun-sérum de lapin homologue à des taux élevés.

2°) Mais aussi des globules rouges humains sensibilisés par un anti C+D d'origine immune jusqu'à 1/10.000

B) Précipitent:

1°) En double diffusion et surtout en immuno-électrophorèse la globuline gamma de lapin (ainsi qu'une bêta 1, une alpha 2 et l'albumine). On notera que ces immun-sérums mettent également en évidence l'arc supplémentaire de mobilité gamma décrit avec l'I-S de bouc anti-sérum de lapin.

2°) La globuline gamma humaine contenue dans la fraction II de Cohn utilisée par le test au latex. On a remarqué une seconde ligne de précipitation de mobilité bêta entre la fraction II et ces immun-sérums.

3°) Les globulines gamma du sérum humain normal ou de P.C.E.

Recherche de l'absence dans le sérum de P.C.E. d'un motif antigénique normal vis-à-vis duquel le malade serait immunisé.

Ce qui devrait entraîner sa disparition "immunologique" du sérum (puisque ce motif serait occupé par l'anticorps correspondant sous forme de complexe soluble).

I) On a vu que ces mêmes immun-sérums étaient incapables de distinguer entre un sérum Gm (a positif) et un sérum Gm (a négatif). Le Gma. est une propriété sérologique quantitative, caractéristique des globulines sériques (gamma par découpage-élution mise en évidence par une réaction d'inhibition de l'agglutination d'hématies sensibilisées par un anti-Rh incomplet par unités agglutinantes de

facteur de P.C.E.)

L'épuisement de ces immun-sérums par des quantités croissantes de sérum humain défini Gm(a-) a montré que lorsque l'I-S était épuisé totalement vis-à-vis de ce sérum Gm(a-) il l'était également vis-à-vis de sérum Gm(a+) .

II) L'épuisement de ce même anti-S.H.N. par des volumes croissants de sérum de P.C.E. a montré que l'on conservait, après épuisement par deux volumes de S.P.C.E., un anticorps vis-à-vis du S.H.N., seulement quand examiné en double diffusion.

Cette ligne floue, en immuno-électrophorèse, s'est révélée correspondre à une alpha 2 globuline.

Quantité de facteur et limites de sensibilité de la méthode

Les réactions de précipitation en gel comptent parmi les moins sensibles des techniques immunologiques. Dans la semi-microméthode 10 γ de protéine, environ constituent le minimum nécessaire pour obtenir un arc visible; le calcul montre qu'en attribuant au facteur un P.M. 900.000, cette quantité représente, pour un sérum ou un éluat titrant 1/512 environ 20 molécules de facteur par couple d'érythrocytes sensibilisés dans le tube réaction où l'échantillon est dilué au 1/512. Ce chiffre, déjà inférieur à la limite d'agglutination dans la réaction de Boyden (Borduas et Grabar ont calculé un chiffre de 100 molécules par couple d'érythrocytes) l'est encore davantage en Heller-Svarts où les titres sont significativement moins élevés : 10 fois environ.

D'ailleurs, selon Ziff, le facteur agglutine les hématies sensibilisées à la dose du γ ; l'unkel mesure de 100 à 3000 γ de complexe 22 S/ml, dans les sérums de P.C.E.; Williams et coll. considèrent avoir purifié à 90%, un facteur agglutinant titrant 5 unités/ γ d'azote, soit environ 1 unité par γ de protéine.

Ces évaluations concordantes s'opposent à la publication de Heimer et coll. selon laquelle l'unité agglutinante correspond à 1 à 3/100 de γ de protéine, soit, ce qui est très peu, de 0,2 à 20 γ de facteur par ml de sérum de P.C.E.

Notre estimation personnelle se situe aux alentours de 1/10 de γ pour l'unité agglutinante.

La discordance n'est peut-être qu'apparente : les systèmes de globules rouges de mouton sensibilisés à 0,25% avec 1/20 de dose agglutinante conduisent dans certaines publications à des titres agglutinants atteignant 1/80.000; alors que les statistiques du laboratoire d'hématologie et des groupes sanguins, portant sur des milliers de sérums, ne font pas mention de titres dépassant 1/2.000 dans le système que nous utilisons.

De plus, les sérums de P.C.E. sont capables de précipiter les globulines γ qui servent à la mise en évidence du facteur anti-globulinique; aussi est-il difficile de penser qu'un facteur caractérisable en gélose par ses propriétés anticorps ne puisse l'être par des propres antigènes.

Une explication pourrait être trouvée en identifiant le 22 S à un complexe soluble immunologique et le facteur élué à l'anticorps isolé. On sait, en effet, que les complexes solubles sont capables de se comporter comme des anticorps vis-à-vis des systèmes sensibilisés par une forte quantité de l'antigène correspondant. Ceci pourrait expliquer que l'activité spécifique (rapport de l'activité à la quantité de macroglobuline) soit beaucoup plus élevée sans que ceci implique une aussi faible quantité de facteur agglutinant dans le sérum de P.C.E.

Pluralité des facteurs sérologiques de la P.C.E.

A) Si dans la quasi totalité des cas, les réactions qui mettent en évidence le facteur agglutinant (et dont la plus commode est celle utilisant les globules rouges O sensibilisés par un I-S de lapin) et le facteur anti-globulinique (essentiellement réactions utilisant le latex sensibilisé, éventuellement réactions de précipitation) fournissent des résultats parallèles dans un petit nombre de cas, il existe une dissociation dans les titres (même en tenant compte des sensibilités inhérentes à chaque technique); et plus rarement encore une véritable discordance : un sérum de P.C.E. fournit une réponse négative pour un facteur, très positive pour l'autre.

Nous pouvons dire que :

- dans le cas d'un sérum possédant les deux activités :

1) la globuline γ aggrégée épuise le sérum en facteur agglutinant, à 90-95% et l'éluat a une activité agglutinante;

2) les systèmes de globules rouges sensibilisés absorbent le facteur anti-globulinique (mais pas totalement) et l'éluat a une activité antiglobulinique;

3) le latex non sensibilisé, dans le cas des sérums qui agglutinent spontanément le latex, épuise toute activité agglutinante et antiglobulinique;

B) Les sérums de P.C.E. discordants, où l'activité seule présente atteint une valeur significativement élevée, sont très rares; on peut les évaluer, d'après les statistiques du laboratoire d'hématologie et des groupes sanguins, à 1 ou 2%.

C) Les systèmes hématies humaines O + sensibilisées par un anti Rh d'origine humaine, permet également, comme nous l'avons vu, de distinguer à l'intérieur des sérums possédant l'activité agglutinante vis à vis des mêmes hématies sensibilisées par l'immunsérum de lapin; un certain pourcentage seulement de ces sérums agglutinent ce système.

D) Par séparation chromatographique sur DEAE cellulose, on aurait pu isoler les deux activités (Ziff et Lospalluto).

On conclura donc qu'il peut exister une légère différence entre les motifs reconnus par la macroglobuline responsable des deux types de réaction, chacun englobant l'autre pour s'étendre plus au moins au delà, ou bien dans l'hypothèse inverse, nous n'avons pas identifié le véritable motif antigénique reconnu par le facteur et nous utilisons des antigènes présentant avec lui des réactions croisées plus ou moins satisfaisantes.

Nature du facteur agglutinant (ou anti-globulinique)

de la P, C. E.

A) Le facteur, complexe non spécifique, présent dans le sérum normal.

Le facteur, si l'on s'en tient à ses seules propriétés physico-chimiques, apparaît comme complexe euglobulinique vrai, de haut poids moléculaire.

Son point isoionique bas tel qu'il ressort des Ph d'élu-tion en chromatographie sur résines (5,5 environ) peut expliquer à lui seul, qu'il soit en mesure de contracter des liaisons hétéropolaires à pH 8, ou 8,2 avec des globu-lines γ dont le point isoélectrique est le plus élevé des protéines du sérum.

1) On se rappelle que le facteur peut être élué de sys-tèmes sensibilisés à pH 5,5 et que dans ces conditions, qui reproduisent les conditions d'élution des résines, les anticorps, même les iso-anticorps et les anticorps hétéro-philes, supposés différents, ne sont pas dissociés de leur antigène; (le pH d'élution étant inférieur à 4,8 pour les anticorps vrais).

2) De même, les résultats des épreuves anti-globuliniques sont très sensibles au pH. Dans ce cas, est-il réellement spécifique ou s'agit-il seulement de l'augmentation d'un métabolite normal ?

Par concentration d'euglobulines de sujet sain (normal ??)

on peut obtenir une réaction d'agglutination significative (en dépit des inhibiteurs décrits dans ces euglobulines) et l'immuno-électrophorèse y révèle une minime quantité de β_2M . Dans la P.C.E., il existe fréquemment des perturbations importantes des épreuves communément appelées hépatiques et l'activité agglutinante serait significativement plus fréquente dans l'hépatite que chez les sujets normaux; cette activité agglutinante des sérums d'hépatite n'a pu être retrouvée, au laboratoire d'hématologie et des groupes sanguins, après examen de 100 sérums provenant d'hépatites virales épidémiques certaines.

Historiquement, a été mise en évidence dès 1912, l'action renforcatrice des euglobulines de cobaye sur l'agglutination bactérienne par un I-S homologue, celle des euglobulines de sérum humain normal dès 1920; et ce n'est qu'en 1940 que Waaler a montré que le sérum de P.C.E. possédait cette propriété à un titre beaucoup plus élevé que les sujets sains ou atteints de diverses affections. Toutefois, il n'a pas été considéré qu'il s'agissait d'une différence qualitative mais bien quantitative.

B) Le facteur, fraction modifiée du complément.

Le fait d'une part que l'on ait acquis la notion de complément congelant mise en évidence chez le boeuf et d'autre part que l'action renforcatrice des euglobulines de cobaye sur l'agglutination de bactéries sensibilisées par l'anticorps homologue ait été identifiée à C'I expliquent

que le facteur ait été assimilé à l'une ou l'autre des fractions classiques du complément hémolytique, i.e. C'1, 2, 3, 4:

a) Sur le plan physico-chimique, un certain nombre de corrélations troublantes en faveur de C' 2,4 : poids moléculaire élevé, teneur en carbohydrates élevé (environ 10%), précipitation à faible force ionique, destruction par la cystéine, interaction réversible qui sont davantage en faveur de l'hypothèse défendue par Hobson et Gerill identifiant le facteur à C'4 plutôt que de celle proposée par Schichikawa et coll. l'identifiant à C'1 .

b) Sur le plan sérologique, la possibilité de se fixer sur des complexes immunologiques constitue la définition du facteur agglutinant comme celle du complément:

Certaines discordances apparentes peuvent être facilement écartées :

1) C'est ainsi que Heidelberger a montré que les γ -globulines dénaturées et agrégées fixent le complément et sont anti-complémentaires; il en est d'ailleurs de même du latex sensibilisé:

3) Le facteur agglutinant ne provoque pas la lyse des hématies sensibilisées alors que l'anticorps sensibilisant est parfaitement hémolytique en présence de C' de cobaye ou de son propre C'; cette observation peut être interprétée comme résultant de la présence dans le sérum de P.C.E. d'une forme modifiée du complément, capable d'entrer en compétition avec la forme active hémolytique:

En effet, d'une part les sérum de P.C.E. ont un titre de complément, évalué avec un autre système de globules rouges sensibilisés, qui est normal ou même augmenté et cependant, d'après les résultats du laboratoire, ils sont souvent fortement anti-complémentaires:

D'autre part, on sait que le complément même dénaturé, et devenu incapable de produire l'effet biologique qui sert à le caractériser, garde la possibilité de se fixer sur les immun-complexes (cette notion est également due à Heidelberger).

Enfin, les techniques de microscopie en fluorescence ont montré que des systèmes Ag/Ac réputés pour ne pas fixer le C' hémolytique fixent des protéines non-anticorps de l'I-S ou d'un sérum frais, étranger, par exemple cobaye ou lapin.

Il peut être objecté que le C' est défini comme permettant la lyse de cellules sensibilisées et que dans ce cas, il n'est plus possible de parler de C'; mais, étant donné que l'on se trouve en présence d'une séquence enzymatique, on est en droit de considérer que la fixation due par inhibition de l'hémolyse exige l'interruption complète de la chaîne et un équilibre totalement en faveur du système C' lié. Il nous paraît possible de concevoir la fixation, en quantité absolue, importante d'une fraction du C' qui, ne constituant pas le facteur limitant de la réaction d'hémolyse, ne peut se traduire par une inhibition de celle-ci.

De nombreux travaux ont montré que le facteur ne pouvait

être identifié ni à C'1, ni à C'4, nous citerons: Laurell et Grubb, Dabeo et Einaudi, ainsi qu'un travail analytique de Smith qui excluent l'identité du facteur avec une quelconque fraction du C'hémolytique.

Cependant, l'absence d'identité du facteur à une fraction de C' ne peut être légitimement affirmée avant d'avoir confronté les propriétés immuno-électrophorétiques du C' hémolytique d'une part, du facteur purifié de la P.C.E., d'autre part.

Le facteur auto-anticorps

Le facteur est-il un anticorps, du type anticorps naturel ou anticorps d'hyperimmunisation résultant d'un processus d'auto-immunisation vraie ou indirecte (réaction croisée)

- 1) Anticorps réagissant avec un motif hétérophile ou de dénaturation des globulines γ humaines.
- 2) un motif spécifique des globulines γ , caractérisant des groupes sériques protéiques, analogues à "l'allotypie" décrite chez le lapin (11) aux groupes sériques de β -globulines décrits chez les bovidés et aux groupes d'haptoglobine décrits chez l'homme.

Le support de cette hypothèse réside dans les réactions d'agglutination de particules sensibilisées par une Fraction II de Cohn convenant soit spontanément (ou du moins en apparence) soit après traitement (par la chaleur : 63° pendant 10 minutes ou par le formol)ainsi que les réactions de précipitation utilisant des mêmes globulines.

Arguments:

1) Existence de communautés antigéniques entre les globulines γ humaines utilisées pour le facteur anti-globuline et l'anticorps de lapin utilisé pour les réactions d'agglutination.

2) Absence d'antigénicité particulière du facteur : on sait que les anticorps ne fonctionnent comme antigènes qu'en tant que globulines de l'espèce qui les a fournis.

3) Appartenance de certains anticorps à la fraction β_2^M (ou S 19)

4) Discordance entre la mobilité du facteur en présence du sérum et isolé, évoquant un complexe soluble en excès de

l'un des constituants.

II) Anticorps anti-liaison

Liaison qui peut être, ou non, immunologique.

Arguments:

Identification du réactif réactant de la Fraction II à un degré de constante de sédimentation S 40.

- Interférence du facteur avec les immun-complexes : 1)
figurés : G.R. sensibilisés
2) solubles : I-S de lapin anti-protéines + protéine homologue

III . Deux hypothèses intermédiaires peuvent également être formulées:

- a) le facteur serait un "anticorps ayant réagi".

Le fait de s'unir à son antigène entraînant une dénaturation non-spécifique (à l'inverse de la liaison) qui le rendrait auto-antigénique; cette auto-immunisation devrait donc apparaître lorsque une immunisation prolongée créerait des quantités importantes d'anticorps unis à leur antigène.

- b) Le facteur serait un anti-complément, du type immuno-conglutinine; cette hypothèse rendrait compte également du nombre de ses propriétés.

Propriétés anticorps du facteur antiglobulinique

Depuis qu'Epstein (6) a montré que le facteur anti-globulinique était capable de donner une réaction de précipitation interfaciale avec certains lots de globuline gamma humaine (fraction II), deux auteurs au moins ont décrits des réactions de précipitation en gélose. Mais l'aspect des images publiées, le délai nécessaire (plus d'une semaine) à leur apparition (considéré comme caractéristique de la participation d'une macroglobuline), la description de plusieurs lignes de précipitation dans certains cas, la fréquence de fausses images de précipitation immunologiques dans le cas des sérums de P.C.E. font qu'elles n'emportent pas la conviction.

De telles images de précipitation ont été reproduites

1°) en précipitation interfaciale,

2°) en Ouchterlony,

en utilisant, comme antigène, différents lots de gamma globuline humaine et animales chauffées ou non, mais il est apparu que seule la méthode I-E pouvait leur donner leur pleine signification.

En obtenant ces images entre:

1°) le facteur concentré ayant migré et la globuline gamma placée dans la rigole-anticorps,

2°) la globuline gamma ayant migré et le facteur concentré placé dans la rigole-anticorps.

Ces montages nous ayant permis de caractériser la nature gamma de l'"anticorps" et la mobilité alpha 2 de l'"antigène" dans le cas d'un auto-anticorps vrai d'origine humaine.

En effet, on a obtenu des images de précipitation:

1°) entre S.P.C.E. et S.H.N. d'une part, gamma animale d'autre part;

2°) entre S.H.N. et sérum "allergique", S.H.N. et S.P.C.E., et S.P.C.E. et un trou pratiqué dans la gélose (n'ayant pas reçu d'antigène).

D'ailleurs Epstein, lui-même, a décrit des images entre S.H.N. et gamma globuline plus "faibles" qu'entre S.P.C.E. et gamma globuline.

Avec des préparations concentrées (5 à 10 fois) de facteur antiglobulinique et fournissant une précipitation interfaciale d'emblée importante (1/4 d'heure), on n'a pu obtenir de résultat positif, même:

1°) en prenant la précaution d'immerger la plaque d'électrophorèse pendant 30 minutes dans un tampon pH 8,2, 0,2 M. (Dans ce cas, l'image de précipitation spontanée qui cerne la cuve contenant la préparation de facteur s'atténue).

2°) En laissant l'I-E se "développer" pendant cinq jours.

On a remarqué que la gamma chauffée était fortement insoluble dans la gélose de l'I-E et donnait une image de précipitation spontanée comparable à celle montrée par certains sérums de P.C.E.

Signification des facteurs sérologiques de la P.C.E.
envisagés comme des auto-anticorps.

Après qu'à la fin du siècle dernier, Metchnikoff et ses élèves, à l'Institut Pasteur de Paris, aient ouvert grand les portes de la médecine à l'immunologie, une longue période d'oubli s'est installée.

En effet, avec la découverte des groupes sanguins par Landsteiner (1900) le domaine médical de l'immunologie s'est identifié à l'immuno-hématologie des globules rouges d'abord, des leucocytes et des plaquettes ensuite. Ce n'est que depuis 1940 avec l'iso-immunisation foeto-maternelle que l'"Immuno-pathologie" est devenue une vedette de la médecine. De ces affections par iso-immunisation, dont le diagnostic de laboratoire permet une thérapeutique spectaculaire, on est passé à l'auto-immunisation d'abord dans le cadre des trois lignées cellulaires sanguines; puis par le biais du LED (où le stigmate hématologique décrit par Hargraves ne constitue que l'illustration locale d'un phénomène analysé, dans les tissus à structure fixe, 20 ans auparavant) à l'immuno-pathologie tissulaire dont l'exemple le plus convaincant qu'il nous ait été donné de voir concerne les thyroïdites avec auto-anticorps.

a) S'agit-il de maladie par auto-immunisation ou de maladies avec auto-immunisation ? La protéine sérique, mise en évidence dans ce cas, est-elle la cause de l'affection ou son témoignage, épiphénomène sans signification pathogénique.

b) Pouvons-nous affirmer qu'il s'agit d'une réaction immuno-logique quand nous observons un précipité, une fixation du complément ?

Dans le cas du facteur sérologique de la P.C.E.,

- 1) Sur le plan diagnostique a) un résultat positif apporte un renseignement précieux même s'il ne fait pas, à lui seul, le diagnostic différentiel entre un P.C.E., un L.E.D. et une macroglobulinémie; b) dans le diagnostic différentiel spondylanthrite-polyarthrite, la réaction sérologique est d'une très grande fidélité; c) reste que, si l'on excepte quelques statistiques qui atteignent 100% , les résultats positifs dans la P.C.E. s'établissent en moyenne à 70%.
- 2) Sur le plan pronostique: il est difficile de s'arrêter à des conclusions nettes, la littérature étant assez contradictoire et les conclusions de chaque auteur ne portant généralement pas sur un nombre élevé de cas ou de déterminations de l'activité agglutinante des mêmes sérums pendant une période suffisamment longue pour voir évoluer l'affection. Souscrivant aux conclusions de notre Maître, le Docteur Eyquem, nous dirons: " la positivité des réactions d'agglutination est en relation avec la gravité de l'affection, les altérations radiologiques et la présence des nodules. Elle est plus indépendante de la durée de la maladie et de la vitesse de sédimentation. Le titre est particulièrement élevé en cas d'affections associées. Lorsque chez un malade, la réaction est devenue positive, elle le reste, indépendamment du traitement".

Ces conclusions n'ont évidemment de valeur que statistique et l'on peut voir des cas extrêmement typiques dans leur

sévérité garder des réactions négatives.

3) Sur le plan pathogénique.

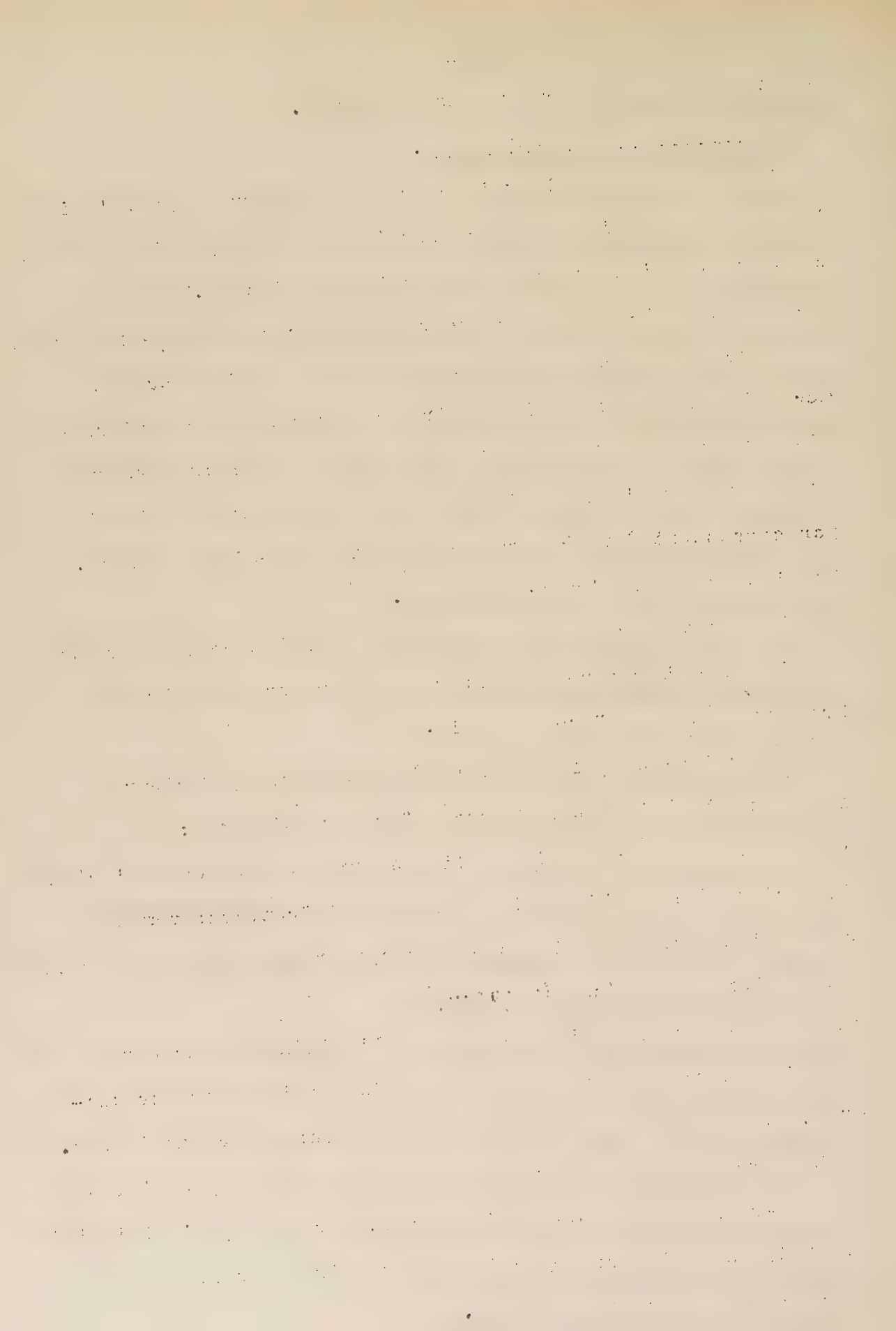
Dans la théorie allergique la plus en vogue aujourd'hui les lésions histologiques caractéristiques de la synoviale sont la conséquence d'une réaction immunologique locale. Mais quel mécanisme peut-on invoquer pour expliquer que des γ -globulines deviennent antigéniques alors que dans le myélome ou les macroglobulinémies de Waldenström où existent des perturbations énormes et facilement décelables par des immunsérums préparés chez l'animal et dont nous savons qu'ils doivent par conséquent être beaucoup moins fins dans leur analyse. On n'observe pas d'auto-anticorps.

Il semble donc que ce passionnant problème comporte encore suffisamment d'inconnues majeures pour mériter de nombreux travaux dont les nôtres à venir.

En particulier , le problème de la nature du facteur agglutinant où le choix pourrait être orienté par :

- 1) la mesure de l'énergie de liaison mise en jeu dans l'union du facteur à ses différents "déterminants" **comparativement** à celle d'une liaison antigène-anticorps vrais, mettant en cause des protéines voisines (γ -anti- γ)
- 2) La démonstration histologique de l'origine du facteur tant du point de vue de son antigène que de celui du facteur lui-même, en même temps que celle du complément et des anticorps.

Les arguments que constituent les différentes propriétés physico-chimiques ou sérologiques qui, peu à peu, l'ont individualisé, pouvant être objectivement utilisés par le tant de chacune des théories proposées.



C O N C L U S I O N S

Nous avons recherché, dans cette thèse, les caractères immuno-électrophorétiques des protéines que nous avons étudiées au cours de la Polyarthrite Chronique Evolutive, et plus particulièrement tenté de préciser les propriétés immunologiques des facteurs qui y sont sérologiquement décelables.

La méthode d'immuno-électrophorèse de Grabar et Williams appliquée à l'étude d'une centaine de sérums de rhumatismes inflammatoires chroniques (essentiellement Polyarthrite Chronique Evolutive et Spondylarthrite), et, utilisant divers immunsérums dont les immunsérums de référence de l' Institut Pasteur (lots 491, 282, 1299), révèle l'existence de modifications identiques à celles observées au cours de tout syndrome inflammatoire chronique : augmentation portant essentiellement sur les α_2 et β -globulines.

Le seul arc auquel on aurait pu attacher une valeur diagnostique, car sa mobilité et ses caractères de solubilité correspond à ceux établis pour les facteurs sérologiques, a pu être identifié à la protéine anti-C (C.R.P.)

Le facteur activateur a été purifié à partir des globules rouges humains, sensibilisés par l'anticorps de lapin correspondant (et dont il provoque spécifiquement l'agglutination); le facteur antiglobulinique a été élué à partir de globulines γ humaines ou animales (Porc et Boeuf) aggrégées par chauffage à 73°.

La technique d'immuno-électrophorèse en fluorescence que nous avons mise au point en utilisant la Lissamine-Rhodamine, nous a permis d'identifier ces facteurs à un système réversible β_2M - γ -globulines. Aux différentes réactions sérologiques utilisées pour leur mise en évidence, participe également une α_2 euglobuline, en quantité plus ou moins importante (qui est une α_2 Macro) mais sans qu'elle soit propre aux sérums de P.C.E. ou nécessaire à l'activité de ces facteurs caractéristiques.

Nous avons pu établir, par immuno-électrophorèse, l'existence d'une communauté antigénique entre les globulines γ humaines chauffées à 63° ou agrégées à 75° , utilisées pour la mise en évidence ou la purification du facteur antiglobulinique et l'anticorps de lapin employé pour la caractérisation ou l'élution du facteur agglutinant.

L'existence d'une marque immunologique, caractéristique de sérums de Polyarthrite Chronique Evolutive a été recherchée par immunisation de Poules et de Lapins, d'une part avec le sérum total ou les euglobulines purifiées de Polyarthrite Chronique Evolutive, d'autre part, soit avec le facteur agglutinant antiglobulinique fixé sur globules rouges sensibilisés, soit avec le facteur antiglobulinique fixé sur latex, sensibilisé ou non.

Dans le premier cas, certains immunosérums, possédant un anti-C.R.P., sont susceptibles de fournir un arc de précipitation faussement caractéristique, dans ce dernier les anticorps obtenus confirment la nature β_2M - γ des facteurs

étudiés ainsi que la participation de l' α_2 -euglobuline.

Certains immunsérums, conservent après épuisement par un excès de sérum humain normal, une ligne de précipitation floue qui semble liée à la présence du facteur sérologique.

V U

et PERMIS D'IMPRIMER

Le Recteur
de l'Académie de Paris,

J. SARRAILH

Le Vice-Président
du Conseil de l'Université de Paris

V U:

Le Doyen,
L. BINET

V U:

Le Président de Thèse
P. MOLLARET

BIBLIOGRAPHIE

- (1) BROWN (P.): in "The agglutination reaction in rheumatoid arthritis" by ZIFF, (M.). J. chron. Dis., 1957, 5, 644-667.
- (2) BURTIN (P.), HARTMANN (L.), HEREMANS (J.) SCHLIDEGGER (J.) WESTENDORP-BOERMA (F.), WIEME (R.), WUNDERLY (C.), FAUVERT (R.) et GRABAR (P.).- Etudes immuno-chimiques et immuno-électrophorétiques des macroglobulinémies. Rev. franç. Et. clin. biol., 1957, 2, 161-177.
- (3) CLEVE (H.) et HARTMANN (E.).- Immuno-elektrophoretische Untersuchungen im Serum Rheumakranker. Klin. Wschr., 1957, 35, 334-340.
- (4) EYQUEM (A.) et PODLIACHOUK (L.).- Le diagnostic biologique des rhumatismes inflammatoires chroniques et des collagénoses. Un volume, 1959. Editions de la Tourelle, Paris.
- (5) EYQUEM (A.), PODLIACHOUK (L.) et JACQUELINE (F.).- Réaction d'agglutination des globules rouges sensibilisés par la globuline gamma. VIème Congrès de la Société Européenne d'Hématologie, Copenhague, 26 août 1957.
JACQUELINE (F.), EYQUEM (A.) et PODLIACHOUK (L.).- Hémagglutination au cours des rhumatismes inflammatoires chroniques. Rev. Rhum., 1957, 24, 385-398.
PODLIACHOUK (L.), EYQUEM (A.) et JACQUELINE (F.).- Le diagnostic de la P.C.D. par agglutination des G.R. humains sensibilisés. Ann. Inst. Pasteur, 1958, 94, 659-662.
- (6) EPSTEIN (W.V.), ENGLEMAN (E.P.) et ROSS (M.).- Quantitative studies of the precipitation and agglutination reactions between serum of patients with "connective tissue" diseases and a : preparation (Cohn fraction II) of human gamma globulin. J. Immunol., 1957, 79, 441-449.
- (7) FRANKLIN (E.C.), HOLMAN (H.R.), MULLER-EBERHARD (H.J.) et KUNKEL (H.G.).- An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. J. exp. Med., 1957, 105, 425.

- (8) GRABAR (P.) et WILLIAMS (C.A.).- Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immuno-chimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. Biochim. et Biophys. Acta, 1953, 10, 193-194.
- (9) KAMINSKI (M.).- Relations immunologiques entre les protéines sériques de quelques mammifères. Bull. Soc. Chim. biol., 1957, 39, suppl. 1, 85-104.
- (10) KUNKEL (H.G.), FRANKLIN (E.C.) et MULLER-EBERHARD (H.J.).- Studies on the isolation and characterization of the "rheumatoid factor". J. clin. Investig., 1959, 38, 424-434.
- (11) OUDIN (J.).- Réaction de précipitation spécifique entre des sérums d'animaux de même espèce. C.R. Acad. Sci. Paris, 1956, 242, 2489-2490.
- (12) PATTE (J.C.), BALDASSAIRE (G.) et LORET (J.).- Etude immuno-électrophorétique des protéinuries normale et pathologiques. Rev. franç. Et. clin. biol., 1958, 3, 960-970.
- (13) SELIGMANN (M.) et HANAU (C.).- Etude immuno-électrophorétique du sérum de malades atteints de lupus érythémateux disséminé. Rev. Hématol., 1958, 13, 239-248.
- (14) SVARTZ (N.).- Agglutination with sensitized sheep erythrocytes in rheumatoid arthritis. Acta med. scand., suppl. 246, 1950, 240.
- (15) ZIFF (M.).- The agglutination reaction in rheumatoid arthritis. J. chron. Dis., 1957, 5, 6, 644-667.

